



Applications d'une modulation pharmacologique des dérivés des formes réactives de l'oxygène pour une optimisation thérapeutique des patients traités par chimiothérapie

Romain Coriat

► To cite this version:

Romain Coriat. Applications d'une modulation pharmacologique des dérivés des formes réactives de l'oxygène pour une optimisation thérapeutique des patients traités par chimiothérapie. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T038 . tel-00776282

HAL Id: tel-00776282

<https://theses.hal.science/tel-00776282>

Submitted on 15 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS 5 RENE DESCARTES
FACULTE DE MEDECINE PARIS DESCARTES

Thèse de Sciences de la Vie et de la Santé

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris 5

Discipline : Cancérologie

Présentée et soutenue publiquement

Par

Monsieur Romain CORIAT

Le 16 novembre 2012

Titre :

**APPLICATIONS D'UNE MODULATION
PHARMACOLOGIQUE DES DERIVES DES FORMES
REACTIVES DE L OXYGENE POUR UNE OPTIMISATION
THERAPEUTIQUE DES PATIENTS TRAITES PAR
CHIMIOTHERAPIE**

Directeur de thèse : Monsieur le Pr Frédéric Batteux

JURY

Monsieur le Professeur Stanislas Chaussade, Président

Monsieur le Professeur Jean-Marc Phelip, Rapporteur

Madame le Docteur Dominique Thabut, Rapporteur

Monsieur le Professeur Eric Raymond, Examineur

Monsieur le Docteur Bernard Weill, Examineur

à Clémentine et Thomas

à Caro

REMERCIEMENTS

Je tiens dans un premier temps à remercier Monsieur le professeur Stanislas Chaussade d'avoir accepté de présider cette thèse, de m'avoir accueilli dans son service et pour son soutien constant dans la réalisation de mes travaux.

Je tiens à remercier Monsieur le professeur Frédéric Batteux pour m'avoir confié ce travail de recherches, son accueil au sein de l'EA 1833, son encadrement et pour ses précieux conseils au cours de toutes ces années.

Je remercie également Monsieur le docteur Bernard Weill, d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je tiens à le remercier pour ses conseils toujours pertinents, sa disponibilité et son soutien sans faille.

Je tiens à remercier Monsieur le professeur Eric Raymond d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie Madame le Docteur Dominique Thabut et le Monsieur le Professeur Jean-Marc Phelip d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie tout particulièrement Carole Nicco et Christiane Chéreau qui m'ont aidé au quotidien dans la réalisation de ce travail du premier au dernier jour et qui crée au sein du laboratoire une ambiance agréable.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes. Que me pardonnent celles que j'oublie ici, mais j'adresse une pensée particulière à : Stanislas Ropert (le coureur du dimanche), Olivier (son presque alter égo sportif), Pascaline, Catherine Brezault (la blonde du 9eme), Juste Leblanc (ou peut être Sarah ?), Ariane Chrysostalis (ou AC), Mathilde, Wioletta, Sandrine, Audrey, Philippe Guilpain, Cécile, Mahaut, ...

Je remercie également Jérôme Alexandre pour m'avoir permis de poursuivre son travail sur le mangafodipir et qui représente une vraie source d'inspiration.

Enfin je souhaiterais remercier mon père pour m'avoir montré depuis des années l'utilité d'une thèse.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION	12
1. Le stress oxydant cellulaire	12
1.1 Introduction et définitions	12
1.2 Principales formes réactives de l'oxygène	14
1.2.1 L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	14
1.2.1.1 Production	14
1.2.1.2 Toxicité	15
1.2.2 Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	15
1.2.2.1 Production	15
1.2.2.2 Toxicité	16
1.2.3 Le radical hydroxyle (OH^{\cdot})	16
1.2.3.1 Production	16
1.2.3.2 Toxicité	17
1.3 Les sources endogènes des formes réactives de l'oxygène	17
1.3.1 L'auto-oxydation des petites molécules	17
1.3.2 Le peroxydosome	18
1.3.3 Le réticulum endoplasmique et le cycle catalytique du cytochrome P450	18
1.3.4 La xanthine oxydase	19
1.3.5 L'acide arachidonique et la lipo-oxygénase	20
1.3.6 La NADPH oxydase	20
1.3.6.1 La famille de la NADPH oxydase ou NOX	20
1.3.6.2 La NADPH oxydase phagocytaire ou NOX2	23
1.3.7 La mitochondrie	26
1.3.7.1 La structure de la chaîne respiratoire mitochondriale et de l'ATP synthase	27
1.3.7.2 Le fonctionnement mitochondrial et la production de FRO	30
1.3.7.3 La modulation de l'activité mitochondriale	32
1.3.7.4 L'effet des FRO sur la mitochondrie	34
1.4 Les systèmes antioxydants	35
1.4.1 La superoxyde dismutase ou SOD	36
1.4.2 La catalase	37
1.4.3 Les glutathion peroxydases et le glutathion	39
1.4.3.1 Les glutathion peroxydases	39
1.4.3.2 Le glutathion	40
1.4.4 Les peroxyrédoxines et la thiorédoxine	43
1.5 Les effets biochimiques du stress oxydant	44
1.5.1 L'action sur l'ADN	45
1.5.2 L'action sur les lipides : la peroxydation lipidique	47
1.5.3 L'action sur les protéines	48
1.5.3.1 L'altération de la chaîne principale	48
1.5.3.2 Les altérations de la chaîne latérale	48

2. L'implication du stress oxydant dans l'oncogénèse	51
2.1 L'augmentation du stress oxydant dans les cellules tumorales	51
2.2 Les effets mutagènes des formes réactives de l'oxygène	53
2.2.1 Le rôle dans l'initiation tumorale	53
2.2.2 Le rôle du stress oxydant dans la progression tumorale	54
2.3 Transmission de signaux intracellulaires par les FRO favorisant le développement tumoral	54
2.3.1 La prolifération et la survie cellulaire	54
2.3.1.1 <i>L'augmentation de la prolifération de lignées tumorales par les FRO</i>	54
2.3.1.2 <i>Les mécanismes</i>	54
2.3.2 L'invasion tumorale	57
2.3.3 L'angiogénèse	57
2.4 Les mécanismes du stress oxydant au cours du cancer	58
2.4.1 L'accroissement de la production des FRO au cours du cancer	58
2.4.1.1 <i>L'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase</i>	58
2.4.1.2 <i>L'augmentation de la production mitochondriale d'anion superoxyde</i>	59
2.4.2 La diminution des capacités anti-oxydantes	61
2.4.2.1 <i>Les superoxyde dismutases</i>	62
2.4.2.2 <i>La catalase</i>	62
2.4.2.3 <i>Le système glutathion, GSH peroxydase (GPx) et GSH réductase (GR)</i>	62
2.4.2.4 <i>Le rôle de la protéine p53 dans la défense contre le stress oxydant</i>	63
2.5 Les variations du stress oxydant au cours de l'oncogénèse	63
3. L'effet anti-tumoral du stress oxydant : Applications thérapeutiques	65
3.1 Les données expérimentales sur l'effet anti-tumoral des FRO	67
3.1.1 L'effets du peroxyde d'hydrogène	67
3.1.2 Les effets de la superoxyde dismutase	67
3.1.3 Les effets des antioxydants	68
3.2 Les mécanismes de l'effet cytotoxique des FRO	68
3.2.1 Les FRO, la mitochondrie et l'apoptose	68
3.2.1 La mise en jeu de voies pro-apoptotiques par les FRO	70
3.2.1.1 <i>L'activation des Stress Activated Protein Kinases (SAPK)</i>	70
3.2.1.2 <i>L'inhibition de NFκB</i>	71
3.2.1.3 <i>L'activation de la voie « sphingomyelinase – ceramide »</i>	72
3.2.1.4 <i>L'activation de p53</i>	73
3.3 Les mécanismes de l'effet cellulaire paradoxal des FRO	74
3.3.1 L'effet dose	74
3.3.2 Le type de FRO	75
3.3.3 Le contexte génétique	76
3.4 La sensibilité des cellules tumorales au stress oxydant et l'équilibre d'oxydo-réduction (Redox)	76
3.4.1 Promouvoir la production de FRO	78
3.4.2 L'interaction avec le métabolisme des FRO	78
3.4.3 Surmonter les mécanismes de résistance liée à une adaptation du système Redox	79
3.4.4 La stratégie thérapeutique basée sur la modulation du stress oxydant	80
3.5 Les mimétiques de SOD et le mangafodipir	84
3.5.1 Les caractéristiques biochimiques de la SOD et de ses mimétiques	84
3.5.1.1 <i>Les mimétiques de CUZnSOD</i>	85
3.5.1.2 <i>L'effet anti-tumoral des mimétiques de la CUZnSOD</i>	85
3.5.1.3 <i>Les mimétiques de MnSOD</i>	86
3.5.1.4 <i>L'association d'un mimétique de la SOD avec un autre traitement anti-tumoral</i>	86
3.5.2 Le mangafodipir	87
3.5.2.1 <i>Le métabolisme du manganèse II</i>	88
3.5.2.2 <i>Le métabolisme du fodipir</i>	89
3.5.2.3 <i>L'effet du mangafodipir sur les cellules tumorales et le tissu sain</i>	89

DEMARCHE EXPERIMENTALE	92
Article 1. L'efficacité anti-tumorale des inhibiteurs de tyrosine kinase dans les carcinomes hépatocellulaires avancés passe par l'induction d'un stress oxydant	95
Principaux résultats	97
Sorafenib-Induced Hepatocellular Carcinoma Cell Death Depends on Reactive Oxygen Species Production <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .	100
Discussion	109
Article 2. La neurotoxicité induite par l'oxaliplatine est prévenue par un mimétique de la SOD, le mangafodipir.	111
Principaux résultats	113
Prevention of Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy by Intravenous Mangafodipir.	115
Discussion	149
Article 3 et 4. L'optimisation thérapeutique en oncologie avec le développement d'une nouvelle classe pharmacologique de modulateurs du stress oxydant, les organochalcogènes.	151
Principaux résultats	153
Synthesis and Selective Anticancer Activity of Organochalcogen Based Redox Catalysts.	156
The Organotelluride Catalyst LAB027 prevents Colon Cancer Growth in the Mice.	166
Discussion	176
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	178
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	180
ANNEXE	205

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les radicaux libres des formes réactives de l'oxygène	13
Figure 2: La dégradation de l'hypoxanthine en acide urique.	19
Figure 3: Les différents isoformes de la NADPH oxydase	21
Figure 4: La structure schématique de la NOX2 et de p22phox d'après Lambeth	24
Figure 5 : L'activation des FRO par phosphorylation et l'assemblage de la NADPH oxydase dans les phagocytes d'après Lambeth	26
Figure 6 : la chaîne respiratoire mitochondriale d'après Mandavilli et al.	28
Figure 7 : la répartition des FRO au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale d'après Beal et al.	32
Figure 8 : Place de la catalase dans la production de FRO.	39
Figure 9 : Structure de la GSH et de la GSSG.	41
Figure 10 : La biosynthèse et la dégradation du GSH d'après Lomaestro et coll	42
Figure 11 : Action de la GSH et de la GSSG selon Liu et al.	43
Figure 12: Actions des FRO sur l'ADN d'après Favier (http://ist.inserm.fr)	45
Figure 13 : FRO et transformation maligne	52
Figure 14: Voies des SAPKs (Stress Activating Protein Kinase) d'après Davis et coll.	56
Figure 15 : Le cercle vicieux du stress oxydant dans la cellule tumorale	61
Figure 16 : La membrane mitochondriale, cible des FRO	69
Figure 17 : L'induction de la mort cellulaire par le stress oxydant : le rôle de NFκB et de JNK	72
Figure 18 : La voie de la céramide et les possibles cibles	73
Figure 19 : « Sauveur et exterminateur : les deux faces de p53 »	74
Figure 20 : Le niveau de FRO dans la cellule normale et dans la cellule tumorale	78
Figure 21 : Formule chimique du mangafodipir	87
Figure 22 : Métabolisme du fodipir	89

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les principales espèces réactives de l'oxygène	14
Tableau 2 : Les NADPH oxydases - localisations, rôles et facteurs régulateurs	22
Tableau 3 : Les systèmes antioxydants chez l'homme	35
Tableau 4: Quelques protéines hypersensibles au stress oxydant	50
Tableau 5 : Liste non exhaustive d'inducteurs de l'apoptose pour lesquels un rôle du stress oxydant intracellulaire a été démontré	66
Tableau 6 : Liste non exhaustive d'agents modulateurs du stress oxydant actuellement en développement	81

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
ATP	adénosine triphosphate
BSO	buthionine sulfoximine
CAT	catalase
CHC	carcinome hépatocellulaire
CMAP	Potentiel d'action musculaire
CYP	cytochrome P450
CuDIPS	Cu(II)(3,5-diisopropylsalicylic acid) ₂
Cys	cystéine
Cyt c	cytochrome C
DDC	diethyldithiocarbamic acid
DHE	déhydroéthidine
DL50	dose létale pour 50% des cellules
DPI	diphenylène indonium
DUOX	dualoxidase
EGF	epidermal growth factor
ERKs	extracellular signal-regulated kinase
FAD	flavine adénine dinucléotide
FMN	flavine mononucléotide
FRO	formes réactives de l'oxygène
GDP	guanine diphosphate
GEF	guanine-nucleotide exchange factor
GPx	glutathion peroxydase
GR	glutathion réductase
GSH	glutathion
GTP	guanine triphosphate
4-HNE	4 hydroxynonénal
HO₂[·]	Hydroperoxyde
HOCl	Acide hypochlorique
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
H₂DCFDA	diacétate de 2'-7'-dichlorodihydrofluoroscéine
IC50	concentration inhibitrice 50
IP	intrapéritonéal
JNKs	c-Jun N-terminal kinases
KDa	Kilo dalton
LOO[·]	radical lipoperoxyde
LOOH	hydroxylipoperoxyde
LOOP	peroxyl lipidique
MAPK	mitogen activated protein kinase
MDA	malone-dialdéhyde
2-ME	2-méthoxy
Mn	manganèse
MnDPDP	mangafodipir
MnTBAP	Mn(III) tetrakis(1-méthyl-4pyridyl) porphyrin
NAC	N-acétyl-cystéine
NADH	nicotinamide adénosine dinucléotide
NADPH	nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate
NO	monoxyde d'azote
NOX	NADPH oxydase
O₂^{-·}	anion superoxyde
O₂	dioxygène

OH·	radical hydroxyle
ONOOH	nitroperoxyde
ONOO-	Peroxinitrites
PBS	phosphate buffer saline
PDGF	platelet direvated growth factor
P38-MAPK	p38 mitogen activated protein kinase
RAC	Oncogène RAC
RAS	Oncogène RAS (Rous avian sarcoma)
Rho-GDI	Rho GDP-dissociation inhibitor
ROO·	Radical peroxyde
SAPKs	Stress Activating Protein Kinase
SOD	superoxyde dismutase
TNF	tumor necrosis factor
Trx	thiorédoxine
Tyr	tyrosine
XO	xanthine oxydase

INTRODUCTION

1. Le stress oxydant cellulaire

1.1 Introduction et définitions

La cellule est continuellement soumise à une production plus ou moins intense de formes réactives de l'oxygène (FRO), contrôlées par un système de détoxification. Cet équilibre entre la production et la détoxification des FRO peut être perturbé sous l'effet de plusieurs sources de stress qui sont liées notamment à des toxines, à des carences nutritionnelles, des chocs, ou des ischémies. Une production excessive de FRO, dépassant les capacités de détoxification entraîne des altérations des tissus ou des organes.

La notion de radicaux libres a été identifiée par les chimistes depuis les années 1930. Cependant c'est seulement dans les années 1970 avec la mise en évidence d'une enzyme clef intracellulaire, la Superoxyde Dismutase (SOD), que cette notion a pu être précisée. Enfin, ce n'est que depuis la fin des années 1990 que le rôle délétère des radicaux libres a été associé aux phénomènes d'apoptose, de stress, d'autophagie et à de nombreuses affections notamment les cancers, les maladies neurodégénératives, et le vieillissement.

Les radicaux libres sont définis comme étant toute espèce chimique capable d'une existence indépendante et possédant une orbitale dont un électron (ou plus) est non apparié (figure 1). Ce radical va pouvoir réagir avec d'autres molécules, de différentes manières, en générant ainsi des actions délétères sur la molécule atteinte, mais également en engendrant la formation d'un nouveau radical, source d'une réaction en chaîne auto accélérée en l'absence de substances anti-radicalaires. Chaque atome est formé de deux éléments : un noyau, composé de protons et de neutrons, et d'électrons gravitant autour du noyau. Les électrons prennent place sur une orbitale où ils sont appariés deux à deux.

Figure 1: Les radicaux libres des formes réactives de l'oxygène [1]

Ils contiennent un ou plusieurs électrons non appariés dans leurs orbitales moléculaires extérieures. La figure montre les électrons dans l'orbitale externe de l'anion superoxyde (a), du radical hydroxyle (b) et de l'hydroxyde (c). Les électrons appariés sont indiqués en vert et les électrons non appariés sont en rouge.

Lorsque les électrons ne sont pas appariés, leur tendance naturelle est d'interagir avec les électrons de molécules ou d'atomes voisins pour reformer des liaisons chimiques covalentes. Cette propriété confère aux atomes ayant des électrons non appariés ou aux molécules qu'ils forment, une grande instabilité et par-là même une extrême réactivité chimique [2, 3]. Les radicaux libres peuvent être formés par la perte ou le gain d'un électron :



Plusieurs radicaux libres dérivent de l'oxygène par la perte d'un électron. C'est le cas de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) et du radical hydroxyle (OH^{\bullet}). D'autres molécules correspondent à des dérivés de l'oxygène et peuvent être des précurseurs de radicaux. Parmi ces molécules dites espèces actives de l'oxygène, on peut citer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$). Les radicaux libres et leurs précurseurs dérivés de l'oxygène correspondent aux FRO [2, 3]. Les FRO vont oxyder les molécules de leur environnement (lipides, protéines et acides nucléiques) qui ne comportent pas d'électron non apparié créant une réaction en chaîne aboutissant à des nouveaux radicaux dits secondaires ($R^{\bullet} + R' \rightarrow R + R'^{\bullet}$) [4, 5].

Conséquence du métabolisme aérobie, les FRO sont produites en continu par toutes cellules eucaryotes. Les FRO sont également éliminées en permanence par plusieurs systèmes enzymatiques ou non dits antioxydants. Leur concentration intracellulaire est ainsi finement

régulée. Une accumulation intracellulaire excessive définit le stress oxydant [6]. Il peut être dû à un excès de production de FRO et/ou à un défaut des systèmes antioxydants.

Le maintien de l'équilibre entre la production de FRO et leur élimination correspond à l'état basal d'une cellule. La viabilité de la cellule nécessite une homéostasie du niveau du stress oxydant. Dans certains cas, notamment en oncologie, un déséquilibre du stress oxydant peut être recherché dans la cellule tumorale afin d'induire la mort cellulaire [7]. Dans les chapitres ci-dessous, nous aborderons les différents points liés au stress oxydant : les FRO, les systèmes antioxydants, l'effet anti-tumoral du stress oxydant et ses applications thérapeutiques

1.2 Principales formes réactives de l'oxygène

Les principales formes réactives de l'oxygène ou FRO sont énumérées dans le tableau 1. Les espèces majoritaires seront détaillées compte tenu de leur implication en oncologie.

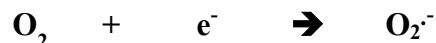
Tableau 1: Les principales espèces réactives de l'oxygène [8]

Radicaux libres	Espèces réactives non radicalaires
Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
Hydroxyle (OH^{\cdot})	Acide hypochlorique ($HOCl$)
Hydroperoxyde (HO_2^{\cdot})	Ozone (O_3)
Peroxyde (RO_2^{\cdot})	Oxygène singulet (1O_2)
Alkoxyde (RO^{\cdot})	Peroxydes organiques ($ROOH$)
Dioxyde de carbone ($CO_2^{\cdot-}$)	Peroxinitrites ($ONOO^-$)

1.2.1 L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

1.2.1.1 Production

L'anion superoxyde est le résultat de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire (O_2), c'est-à-dire, l'addition d'un électron supplémentaire à l'oxygène moléculaire :



L'anion superoxyde est produit pendant le métabolisme cellulaire aérobie au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Dans les conditions normales, les mitochondries sont le siège de 90% de la production d'anion superoxyde intracellulaire [9]. Les autres sites de production, quantitativement de moindre importance, sont la NADPH oxydase, située dans la membrane et la xanthine oxydase, située dans le cytoplasme, et le cycle catalytique du cytochrome P450 qui siège principalement dans le réticulum endoplasmique.

1.2.1.2 Toxicité

La durée de vie de l'anion superoxyde est relativement longue (jusqu'à quelques dizaines de secondes) car il est peu réactif en milieu aqueux. Il peut ainsi diffuser assez loin de son lieu de production. Toutefois sa charge électrique négative le rend incapable de diffuser à travers les membranes biologiques [10]. La toxicité de l' $O_2^{\cdot-}$ s'exerce préférentiellement de manière indirecte. En effet, en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), il donne naissance au radical hydroxyle (OH^{\cdot}) (réaction de Haber Weiss). Il peut également, en réagissant avec le monoxyde d'azote (NO), conduire à la formation de peroxynitrites ($ONOO^{\cdot}$) dont la toxicité est maintenant bien établie [11, 12]. En outre, la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène est rapide et principalement gérée par les superoxyde dismutases (SOD), même si il existe une dismutation très faible et spontanée de l'anion superoxyde.

1.2.2 Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

1.2.2.1 Production

Le peroxyde d'hydrogène résulte de la dismutation de l'anion superoxyde par dismutation:



L' H_2O_2 , produit par la dismutation d' $\text{O}_2^{\cdot-}$, est beaucoup plus stable que l' $\text{O}_2^{\cdot-}$, et a la capacité, contrairement à l' $\text{O}_2^{\cdot-}$, de diffuser à travers les membranes biologiques. Cette réaction est catalysée par la SOD mais peut aussi se produire de manière spontanée.

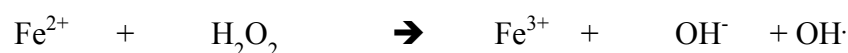
1.2.2.2 Toxicité

Le peroxyde d'hydrogène a la capacité de traverser les membranes biologiques [13]. De ce fait, et compte tenu également d'une faible réactivité, l' H_2O_2 peut se retrouver à une grande distance de son lieu de synthèse. Sa toxicité est principalement liée au fait qu'en présence d'ions métalliques, tels que les ions ferreux (Fe^{2+}) et cuivreux (Cu^{2+}), l' H_2O_2 peut se réduire par la réaction de Fenton en radical hydroxyle (OH^{\cdot}). La réaction de Fenton est une réaction d'oxydation avancée aboutissant à la formation du radical hydroxyle OH^{\cdot} qui est le deuxième oxydant le plus toxique présent dans la nature après le fluor. L' H_2O_2 peut également interagir directement avec des protéines et d'autres molécules contenant des groupements thiols en oxydant leur groupement sulfhydryle (-SH).

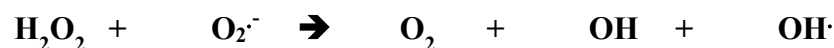
1.2.3 Le radical hydroxyle (OH^{\cdot})

1.2.3.1 Production

La principale voie de production du radical hydroxyle est la réaction de Fenton qui implique des cations métalliques:



Il est bien établi que la production du radical hydroxyle en présence d'oxygène est liée la concentration en métaux [14]. Ceci est particulièrement vrai pour le fer (exemple ci dessus) mais d'autres cations métalliques comme le cuivre peuvent également conduire à la production d' OH^{\cdot} [15]. La production de radical hydroxyle peut également se faire indépendamment des cations métalliques par l'interaction entre l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, c'est la réaction d'Haber-Weiss:



1.2.3.2 Toxicité

Parmi les FRO intracellulaires, le radical hydroxyle est l'oxydant le plus réactif et le plus puissant. En effet, il peut réagir avec toutes les molécules environnantes, et intervient ainsi directement dans la dégradation des acides nucléiques (ADN), la peroxydation lipidique et l'oxydation des protéines [16]. A ce titre, il représente une source potentielle de lésions moléculaires, cellulaires et tissulaires. Cette toxicité est due à son extrême réactivité qui se traduit par des constantes de vitesse ($k(\text{OH}\cdot + \text{substrat})$) comprises entre 10^8 et $10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. La durée de vie des radicaux $\text{OH}\cdot$ est extrêmement faible (d'environ 10^{-9} secondes) et les distances qu'ils peuvent parcourir sont également très faibles (inférieures à la dizaine de nanomètres) [17]. Ce sont donc, à l'opposé de l' H_2O_2 , des radicaux qui diffusent peu et qui réagissent quasiment sur le lieu de leur production. Les radicaux hydroxyles réagissent selon trois modes d'action :

- en arrachant un électron :



- en arrachant un atome d'hydrogène (d'un substrat organique RH) :



- en s'additionnant sur les doubles liaisons :



1.3 Les sources endogènes des formes réactives de l'oxygène

Dans l'organisme, il existe de nombreuses sources de FRO dont l'importance varie selon les tissus. On distingue deux groupes de FRO selon leur origine enzymatique ou non [18-21].

1.3.1 L'auto-oxydation des petites molécules

L'auto-oxydation de molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones est une source de FRO [22]. Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l' $\text{O}_2\cdot^-$. Ainsi, l'auto-oxydation de la dopamine est en partie impliquée dans le processus

apoptotique lors de pathologies neuro-dégénératives, notamment lors de la maladie de Parkinson [20]. Il a été mis en évidence que la formation de quinone par auto-oxydation de la dopamine endogène jouait un rôle majeur dans la dysfonction dopaminergique observée de cette maladie [23, 24].

1.3.2 Le peroxysome

Un peroxysome est un organe cellulaire entouré par une membrane simple et ne contenant pas de matériel génétique. Un peroxysome contient de nombreuses enzymes générant une grande quantité d'H₂O₂. Toutefois l'H₂O₂ généré est rapidement détecté par la catalase peroxysomale. Cette utilisation par la catalase joue un rôle particulier dans l'homéostasie. Cette réaction est particulièrement rénale et hépatique puisqu'un dysfonctionnement de la catalase peroxysomale accélère l'atteinte rénale chez les patients diabétiques [25].

1.3.3 Le réticulum endoplasmique et le cycle catalytique du cytochrome P450

Le réticulum endoplasmique est un sous compartiment de la cellule. Il est séparé en réticulum endoplasmique rugueux et lisse. Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent des réactions de détoxification des drogues liposolubles et d'autres métabolites toxiques. La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques tout en produisant des FRO.

Les cytochromes P450 (CYP450) sont des complexes enzymatiques qui utilisent le dioxygène pour oxyder un substrat [3, 5]. Le fonctionnement des CYP450 requiert un agent réducteur, généralement le NADPH. La réaction catalysée par le CYP450 peut être résumée par l'équation suivante :



où AH est le substrat et RH₂ l'agent réducteur.

Il existe chez l'homme de multiples isoformes des CYP450 qui sont chacun spécifique d'un ou plusieurs substrats. Ces substrats peuvent être un stéroïde, un acide biliaire ou un

xénobiotique. La réaction catalysée par le CYP450 peut parfois conduire à la formation d' $O_2^{\cdot-}$ lorsque l' O_2 subit une réduction monovalente. Certains CYP450, tel que le 2E1 impliqué dans le métabolisme de l'alcool, sont particulièrement pourvoyeurs d' $O_2^{\cdot-}$. La majorité des CYP 450 sont localisés dans le réticulum endoplasmique. Certains sont cependant de siège mitochondrial [26]. Ces CYP450 mitochondriaux possèdent une composante supplémentaire, la ferrédoxine qui joue le rôle de donneur d'électrons intermédiaire entre le NADPH et le substrat. Cette réaction de transfert est catalysée par la ferrédoxine réductase. Lorsque la concentration de ferrédoxine est limitée, la ferrédoxine réductase peut être responsable de la formation d' $O_2^{\cdot-}$ [27].

1.3.4 La xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) est une des deux formes de la xanthine oxydoréductase (XOR), l'autre étant la xanthine déshydrogénase (XDH) chez l'homme [28]. La XOR est chez l'homme la principale enzyme responsable de la dégradation des bases puriques. Elle catalyse les deux dernières étapes, c'est à dire l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et catalyse la xanthine en acide urique :

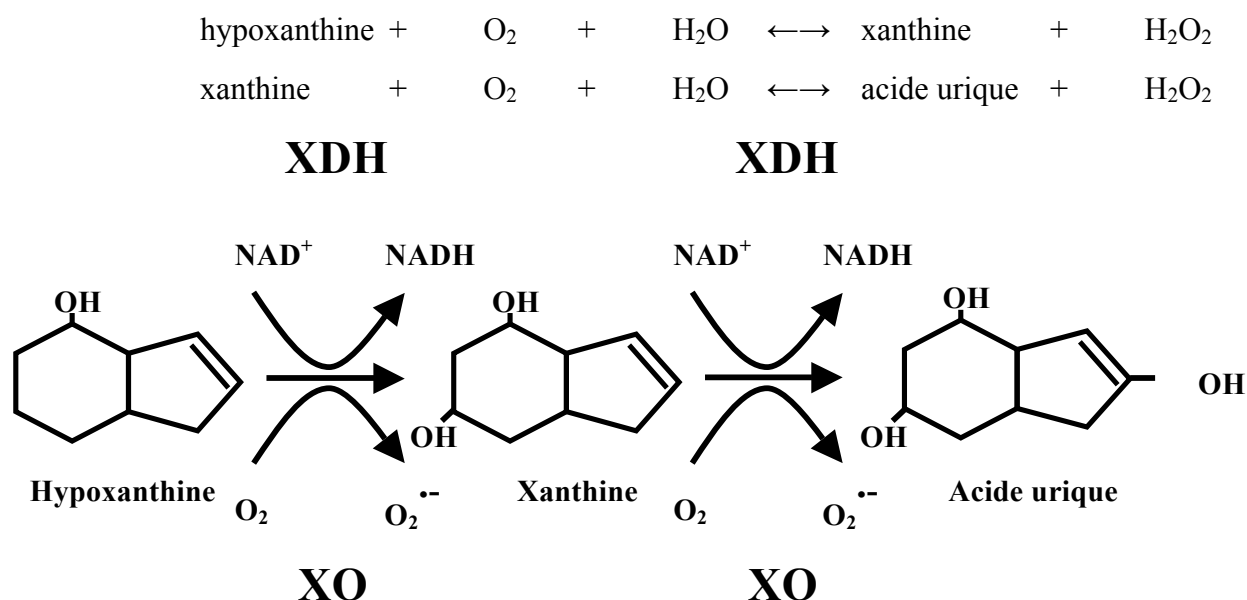


Figure 2: La dégradation de l'hypoxanthine en acide urique.

Ce schéma illustre la transformation de l'hypoxanthine par la xanthine oxydase puis la conversion de la xanthine en acide urique.

La xanthine oxydase est une enzyme soluble qui produit ainsi des FRO [29]. Cette enzyme est présente dans le sang, les cellules endothéliales des capillaires, et dans le foie et l'intestin grêle. La localisation cellulaire de la xanthine oxydase est principalement cytoplasmique. La production de FRO par la xanthine oxydase est faible en condition basale, mais jouerait un rôle dans les phénomènes d'ischémie - reperfusion [30-33].

La xanthine oxydase entraîne la réduction de l'oxygène en O_2^- . Cependant, *in vivo*, l'essentiel de l'oxydation de la xanthine et de l'hypoxanthine est assuré par la xanthine déshydrogénase qui utilise préférentiellement comme accepteur d'électrons la NAD^+ [28, 34, 35]. Dans les conditions normales, le métabolisme des bases puriques entraîne donc une source négligeable d'anion superoxyde [5]. La conversion de la XDH en XO peut cependant survenir au cours du syndrome d'ischémie - reperfusion. Une forte production d'anion superoxyde est alors être observée au cours de ce phénomène [5].

1.3.5 L'acide arachidonique et la lipo-oxygénase

L'acide arachidonique provient de l'hydrolyse des phospholipides par la phospholipase A2. L'acide arachidonique est un acide gras polyinsaturé qui joue un rôle de second messenger via une voie de signalisation impliquant le contrôle de la protéine kinase C et de la MAP kinase p38. Ainsi dans les phénomènes d'apoptose ou de prolifération cellulaire on observe la libération de grandes quantités de FRO [36, 37]. L'acide arachidonique est le substrat de la lipo-oxygénase pour la synthèse des leucotriènes. Cette synthèse met en jeu une série d'oxydations qui implique la production de FRO. La production de FRO par cette voie pourrait jouer un rôle dans le cadre de l'initiation de la réponse inflammatoire.

1.3.6 La NADPH oxydase

1.3.6.1 La famille de la NADPH oxydase ou NOX

La NADPH oxydase (NOX) est un complexe enzymatique membranaire qui catalyse la réaction d'oxydation de la NADPH par le dioxygène (O_2), et produit ainsi du $NADP^+$, du H^+ et de l' O_2^- [38-40]:



Les NOX sont des protéines multimériques transmembranaires. Elles siègent au sein de la membrane plasmique, membrane nucléaire et de certaines membranes intracellulaires, vacuoles phagocytaires ou phagosomes et vésicules sécrétoires (figure 3) [41].

Figure 3: Les différents isoformes de la NADPH oxydase [42]

Les membranes cellulaires sont indiquées en gris, les protéines essentielles en jaune, les protéines activatrices en vert et les protéines de liaison en bleu. PM : membrane plasmatique.

Chez l'Homme, il existe 7 variantes de la NADPH Oxydase: NOX1, 2, 3, 4, 5 et DUOX (dualoxidase) 1 et 2. La NADPH oxydase a été initialement décrite dans les cellules phagocytaires (principalement NOX2) où elle joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire lors de la lutte contre les micro-organismes. Les principales fonctions des NOX sont rappelées dans le tableau ci-dessous (tableau 2).

Tableau 2 : Les NADPH oxydases - localisations, rôles et facteurs régulateurs [39-41, 43, 44]

	Expression préférentielle	Rôles connus	Facteurs régulateurs
NOX1	Epithélium colique, kératinocyte, cellule endothéliale et musculaire lisse vasculaire, prostate, utérus	Défense antibactérienne Transmission du signal	NOXO1, NOXA1 RAC1
NOX2	Phagocyte, cellule endothéliale	Défense antibactérienne	p47, p40, p67phox, RAC1/RAC2
NOX3	Oreille interne	Développement embryonnaire	Inconnu
NOX4	Epithélium rénal, ostéoclaste, ovaire, œil, cellule musculaire lisse vasculaire	Défense antibactérienne Transmission du signal	Inconnu
NOX5	Lymphocyte, spermatozoïde, épithélium mammaire, cervelet	Inconnu	Calcium
DUOX1	Epithélium pulmonaire thyroïde, cervelet,	Défense antibactérienne Synthèse des hormones thyroïdiennes	Calcium
DUOX2	Thyroïde, colon, îlots pancréatiques, prostate	Synthèse des hormones thyroïdiennes	Calcium

Structures

Les différents homologues de la NADPH oxydase se distinguent par leur sous-unité alpha du flavocytochrome b₅₅₈. NOX1, NOX3 et NOX4 possèdent une sous-unité alpha très proche de la sous-unité gp91 de NOX2. NOX5 possède à son extrémité N-terminale un domaine « calmoduline-like » contenant quatre sites de fixation du calcium. A ce titre NOX5 est inductible par le calcium [45]. Les enzymes DUOX possèdent également un domaine de fixation du calcium ainsi qu'un domaine à activité peroxydase à leur extrémité N-terminale, extracellulaire. Comme l'illustre la figure 3, toutes les isoformes de NOX sont des protéines membranaires et sont localisées dans la membrane plasmique. En outre, NOX1 a été trouvé à la membrane plasmique dans les cavéoles [46], NOX2 dans les membranes des phagosomes et NOX4 dans la membrane mitochondriale [47] et sur la membrane des cellules endothéliales [48], ainsi que dans le noyau [49].

La NOX2 est la seule NADPH oxydase phagocytaire. Les NADPH oxydases non phagocytaires présentent certaines caractéristiques fonctionnelles communes [50-52]:

- leur activité enzymatique est environ trois fois plus faible que celle de NOX2.
- après activation, la production d'anion superoxyde ne devient détectable qu'au bout de quelques minutes à quelques heures, contre quelques secondes pour la NOX2.
- elles présentent une faible activité basale responsable d'une production continue d'anion superoxyde.
- la plupart des NOX non phagocytaires siègent au niveau de la membrane plasmique.

Fonctions

Les NADPH oxydases exprimées sur des épithéliums de surface (colon, poumon...) ont un rôle de défense antibactérienne [43, 44, 53]. Les enzymes DUOX sont impliquées dans la biosynthèse des hormones thyroïdiennes [54]. Le rôle majeur des NOX est de participer à la transmission du signal en réponse à plusieurs hormones et facteurs de croissance. Ainsi l'activité de NOX1 et NOX4 est augmentée dans les cellules musculaires lisses vasculaires par la fixation du PDGF et de l'angiotensine II sur leur récepteur membranaire respectif [55]. NOX1 est nécessaire à la transmission du signal mitogène induit par l'EGF sur des fibroblastes [56], tandis que NOX4 est impliquée dans la transduction du signal induit par l'insuline dans les adipocytes [57]. Il a été montré que l'implication de la NADPH oxydase dans la transmission du signal est bien liée à la production de FRO [58, 59].

1.3.6.2 La NADPH oxydase phagocytaire ou NOX2

La NADPH oxydase phagocytaire, NOX2, fut la première identifiée et reste la mieux connue. La NOX2 est principalement exprimée dans les phagocytes professionnels (polynucléaires neutrophiles, polynucléaires éosinophiles, monocytes et macrophages) mais peut également être retrouvée dans les cellules endothéliales [38-40]. L'activation de NOX2 induit une forte concentration de radicaux libres dans le phagosome qui vont participer à la destruction du micro-organisme en oxydant massivement les protéines, les lipides et l'ADN [43, 44].

Structure

La NOX2 est un complexe enzymatique multi protéique qui lorsqu'il est activé est composé de six éléments [44, 53, 60]:

- **Deux éléments transmembranaires** qui forment le flavocytochrome b_{558} et constituent le noyau catalytique de l'enzyme :

- **gp91^{PHOX}** ou sous-unité alpha avec une partie C-terminale cytoplasmique. Le gp91^{PHOX} contient les sites d'attache du FAD (flavine adénine dinucléotide) et du NADPH. Le diphenyleneiodonium (DPI) inhibe la NADPH oxydase en se fixant sur le site de la FAD.
- **p22^{PHOX}** avec une partie C-terminale riche en proline.

Figure 4: La structure schématique de la NOX2 et de p22phox d'après Lambeth [44]

Les régions transmembranaires α -hélicoïdales sont représentées par des cylindres, avec la boucle cytosol-face B reliant les hélices 2 et 3, et les hèmes sont indiquées en rouge, avec des résidus histidine conservés dans les hélices 3 et 5 fournissant les ligands axiaux et distaux des hèmes ferreux. L'hélice 6 est reliée au domaine globulaire flavoprotéine qui contient de la FAD. NOX2 est associée à la membrane avec p22phox, qui présente 2 segments transmembranaires de formes α -hélicoïdales et dont chaque extrémité C-terminale contient une région riche en proline (PRR) qui est la cible de bis-p47phox.

- **Trois composants cytosoliques** $p47^{\text{PHOX}}$, $p67^{\text{PHOX}}$, et $p40^{\text{PHOX}}$ permettent une régulation étroite de l'activité de la NADPH oxydase. Au repos, elles forment un complexe cytosolique de 250 kda. L'assemblage de ce complexe au flavocytochrome b_{558} est nécessaire à l'activation de l'enzyme. Le composant $p47^{\text{PHOX}}$ est responsable, après activation, du transport des sous-unités cytosoliques vers la membrane [61]. A l'inverse des autres sous-unités, le composant $p47^{\text{PHOX}}$ n'est pas totalement indispensable à l'activation de la NADPH oxydase [62]. Le composant $p67^{\text{PHOX}}$ contient un "domaine d'activation" qui agit avec le flavocytochrome et participe au transfert d'électrons [63]. Le composant $p67^{\text{PHOX}}$ interagit avec la protéine Rac-GTP via sa partie N-terminale [64]. Le composant $p40^{\text{PHOX}}$ interagit avec les deux autres composants $p67^{\text{PHOX}}$ et $p47^{\text{PHOX}}$ et son rôle est moins bien établi [43, 44].

- **RAC GTPase** : RAC est une petite protéine G, appartenant à la superfamille des protéines Rho GTPases. Il existe deux types de protéines RAC : RAC1 et RAC2. RAC1 est ubiquitaire tandis que l'expression RAC2 est limitée aux cellules hématopoïétiques [43, 44]. L'activité de RAC est déterminée par le type de nucléotide à guanine auquel elle est liée. Le GDP (guanine diphosphate) maintient la protéine dans l'état inactif tandis que le GTP (guanine triphosphate) induit l'état actif, permettant de ce fait l'interaction avec des effecteurs et la propagation du signal d'aval. La conversion entre les états actifs et inactifs est réglée par les GEFs (guanine-nucleotide exchange factors), qui favorisent la libération du GDP et permettent au GTP de se lier, et par les GAPs (GTPase activating proteins) qui au contraire augmentent le taux d'hydrolyse du GTP [65, 66]. Au repos, RAC est liée à une protéine inhibitrice Rho-GDI (Rho GDP-dissociation inhibitor) [67]. Rho-GDI empêche l'interaction de l'extrémité C-terminale, geranyl-geranyl, de RAC avec la membrane contribuant ainsi à ce que RAC reste uniquement dans le cytoplasme.

Activation de la NADPH oxydase : Phosphorylation et assemblage

La phosphorylation est un des événements majeurs dans l'activation de la NOX2. De multiples phosphorylations de $p47^{\text{PHOX}}$ sont indispensables pour lever l'auto-inhibition et ainsi permettre la translocation à la membrane et l'association avec le flavocytochrome (figure 5) [68]. La PKC (protein kinase C) joue un rôle majeur dans cette phosphorylation

[69]. La p38 MAPK (p38-mitogen activated protein kinase) [70], la PAK (p21-activated kinase) [71] et la protéine kinase B/Akt [72] peuvent également contribuer à la phosphorylation de p47phox. Lors de l'activation de la cellule, il se produit un clivage entre RAC et Rho-GDI. RAC migre alors à la membrane plasmique et peut échanger le GDP contre du GTP [73]. RAC hydrolyse le GTP, activant ainsi la NADPH oxydase [74, 75]. RAC lié au GTP pourrait se lier à p67-phox, entraînant un changement dans sa conformation au niveau de la partie C-terminale et conduisant à la dissociation du complexe p67-phox/p40-phox, pour permettre à p67-phox libre d'agir avec le cytochrome b₅₅₈ [76].

Figure 5 : L'activation des FRO par phosphorylation et l'assemblage de la NADPH oxydase dans les phagocytes d'après Lambeth [43]

L'activation du système gp91phox se produit par au moins trois déclencheurs de signalisation qui conduisent à l'assemblage des protéines cytosoliques régulatrices (p40phox, p47phox et p67phox) avec le flavocytochrome b₅₅₈. Ces déclencheurs impliquent des protéines kinases, des enzymes métabolisant les lipides et des protéines facteurs d'échange de nucléotides qui activent la GTPase-RAC. Les protéines kinases catalysent des phosphorylations de la région auto-inhibitrice (AIR) de p47phox, ce qui lui permet de se lier à p47phox et p22phox.

1.3.7 La mitochondrie

La mitochondrie est un organite intracellulaire qui produit la majorité de l'énergie pour la cellule sous forme d'ATP. Son rôle est donc crucial pour le fonctionnement de la cellule et

pour sa survie. De plus la mitochondrie, via le fonctionnement de la chaîne respiratoire, est considérée comme une des principales sources de FRO dans la cellule. La mitochondrie possède un système de double membrane (interne et externe) qui délimite l'espace matriciel mitochondrial dans lequel se trouvent, entre autres, les enzymes des voies métaboliques de Krebs et de la β -oxydation. Le catabolisme des glucides, acides gras et acides aminés s'accompagne de la production d'équivalents réduits que sont le NADH et le FADH₂. L'oxydation de ces équivalents réduits par l'O₂ a lieu au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et aboutit à la formation d'énergie.

1.3.7.1 La structure de la chaîne respiratoire mitochondriale et de l'ATP synthase

La chaîne respiratoire mitochondriale est la résultante de l'association d'une cinquantaine de polypeptides et permet la production d'énergie sous forme d'ATP en utilisant le dioxygène. Elle est composée de cinq complexes protéiques (I à V) situés dans la membrane interne des mitochondries. La chaîne respiratoire mitochondriale utilise deux transporteurs d'électrons, le nicotinamide adénosine dinucléotide (NADH) et le flavine adénosine dinucléotide (FADH₂), pour faire subir à l'oxygène une réduction tétravalente par addition de 4 électrons (e⁻) et de 4 protons (H⁺) conduisant à la production d'eau [9]:



L'énergie dissipée par ce processus d'oxydo-réduction permet le transfert transitoire de protons de la matrice à l'espace inter membranaire, ce qui est à l'origine d'un gradient de potentiel transmembranaire (dénommé $\Delta\Psi_m$). La phosphorylation de l'ADP mitochondrial en ATP se produit grâce à ce gradient de protons (figure 6).

Figure 6 : la chaîne respiratoire mitochondriale d'après Mandavilli et al. [77]

Le NADH est formé par l'oxydation de l'acétyl CoA au cours du cycle de Krebs. Le FADH_2 est réduit à partir du succinate, également issu du cycle de Krebs [5]. Les complexes I, III et IV agissent pour catalyser le transfert des électrons du NADH à l'oxygène, et les complexes II, III et IV du succinate à l'oxygène. Les électrons sont transférés des complexes I et II au complexe III par l'ubiquinone ou coenzyme Q_{10} (CoQ) et du complexe III au complexe IV par le cytochrome c (Cyt). La réduction tétravalente de l'oxygène a lieu au niveau du complexe IV. L'ATP est synthétisée au niveau du complexe V. En plus de l'ATP et de l'eau, la chaîne respiratoire produit en continu des anions superoxydes par une réduction monovalente de l'oxygène. Il est estimé qu'environ 0.2 % de l'oxygène consommée par la chaîne respiratoire conduit à la formation d'anion superoxyde par des fuites d'électrons qui se combinent directement à l'oxygène [78].

Le Complexe I : NADH oxydo-reductase (déshydrogénase - Coenzyme Q réductase)

Au niveau du complexe I, le transfert initial d'électrons nécessite le cofacteur équivalent réduit NADH et permet le transfert d'électrons, du NADH au co-enzyme Q. Ce complexe protéique est composé de 46 sous-unités et contient une flavine-mononucléotide (FMN). Le FMN et le co-enzyme Q sont des intermédiaires capables d'accepter un ou deux électrons en raison de leurs formes semi quinone stables [5]. Le complexe I produit la majeure partie de l'anion superoxyde dans les mitochondries intactes [79, 80]. Cette production d' $\text{O}_2^{\cdot -}$ se fait principalement du côté de la matrice de la membrane interne [78, 80, 81]. La roténone, inhibiteur du complexe I, peut augmenter la production d' $\text{O}_2^{\cdot -}$ en empêchant le transfert des électrons sur le co-enzyme Q et en favorisant leur réaction avec l'oxygène [79, 82].

Le Complexe II : Succinate déshydrogénase - Coenzyme Q réductase

Le succinate réduit la FAD en FADH₂ et est oxydé simultanément en fumarate. Le complexe II transfère alors les électrons du FADH₂ au co-enzyme Q. Le complexe II permet ainsi la réduction du co-enzyme Q en court-circuitant le complexe I qui n'est donc pas totalement indispensable au fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Le Complexe III (CoQ-Cyt c oxydoréductase)

Ce complexe transfère les électrons du co-enzyme Q réduit au cytochrome c. Il contient 2 cytochromes b (b₅₆₂ ou b_L et b₅₆₆ ou b_H), une sous-unité à centre Fe-S et le cytochrome c₁, qui vont servir d'intermédiaires successifs pour ce transfert d'électrons. Les électrons aboutissent au Cyt c₁^{ox} qui devient par le fait même réduit. Le Cyt c₁^{red} s'oxyde alors en transférant son électron au cyt c^{ox} qui est associé au complexe III. En passant à l'état réduit, le cyt c^{red} se dissocie du complexe III, migre le long de la surface de la membrane interne et enfin interagit avec la cytochrome c oxydase au niveau du complexe IV. Tout comme le complexe I, le complexe III produit de l'anion superoxyde [81]. L'antimycine A, inhibiteur du complexe III qui bloque le transfert d'électrons du cyt b au cyt c₁ est responsable d'une augmentation de la production d'anion superoxyde [78, 81].

Le Complexe IV ou cytochrome c oxydase

Il contient les cytochromes a et a₃, et deux ions cuivre qui sont cruciaux pour le transfert des électrons du cyt c^{red} à l'oxygène et la synthèse simultanée de deux molécules d'eau. Le complexe IV catalyse la dernière réaction d'oxydoréduction qui réduit l'O₂ en H₂O par 4 électrons. Le transfert des électrons est irréversible contrairement à celui ayant lieu aux complexes I et III. Ce transfert d'électrons est associé à un efflux de protons vers l'espace inter membranaire.

Le Complexe V ou l'ATP synthase

L'ATP synthase (F₀F₁-ATP synthase) est un complexe protéique enzymatique qui se trouve dans les crêtes mitochondriales, la membrane des thylakoïdes, et la membrane plasmique des bactéries. L'ATP synthase couple la diffusion facilitée des protons à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi) et permet donc de transformer la différence de potentiel électrochimique de protons en énergie chimique. L'ATP synthase est inhibée par l'oligomycine qui bloque le transport de protons.

1.3.7.2 Le fonctionnement mitochondrial et la production de FRO

Selon la théorie chimio-osmotique de Mitchell [83], les oxydations des équivalents réduits (NADH et FADH₂) dans la chaîne de transport d'électrons (ETC) sont couplées à un efflux de protons depuis la matrice vers l'espace inter membranaire. Comme la membrane interne mitochondriale est peu perméable aux protons, un gradient électrochimique (Δ potentiel électrique et Δ pH) est ainsi produit. Ce gradient de protons représente donc une force poussant les protons à retourner dans la matrice mitochondriale. Lorsque les protons retournent dans la matrice par l'ATP synthase, l'énergie alors libérée permet la synthèse d'ATP par phosphorylation. Les oxydations et les phosphorylations sont donc couplées. Ce couplage peut être plus ou moins efficace et il a été défini des états respiratoires de repos et stimulé en fonction de la disponibilité en ADP.

La situation rencontrée au sein d'une cellule est celle d'un état intermédiaire entre les états respiratoire de repos, correspondant à l'état basale d'oxygène et sans phosphorylation, et l'état respiratoire stimulé avec la présence d'ADP en quantité suffisante afin de permettre les phosphorylations et donc la synthèse d'ATP par l'ATP synthase. Compte tenu de cela, il est établi que le fonctionnement même de la chaîne respiratoire entraîne la production de FRO en conditions physiologiques [84]. Il a été également montré que la production d'H₂O₂ par la chaîne respiratoire mitochondriale est directement liée à la dismutation de l'anion superoxyde.

La production de FRO est conditionnée au flux d'électrons dans la chaîne respiratoire et au degré de réduction des transporteurs d'électrons. Il apparaît néanmoins que la production d'anion superoxyde soit moins liée au flux d'électrons qu'au potentiel membranaire. En effet, une relation directe a été mise à jour entre le potentiel de membrane et la production d'anion superoxyde [85]. De même, il a été mis en évidence que la production de H₂O₂ produit par les mitochondries oxydées peut être inhibée par un découplant protonophore de l'ADP et du phosphate, par exemple le malonate, la roténone et le myxothiazol, et stimulée par l'antimycine A [86]. L'effet de l'ADP sur la mitochondrie est également abolie par la carboxy atractylate et l'oligomycine. Une valeur seuil du potentiel membranaire a été identifiée au-dessus de laquelle une forte augmentation de la production de H₂O₂ est retrouvée. Ces données mise en évidence par Korshunov et al [86] sont en droite ligne avec le concept de Skulachev et al [87, 88] qui suggéraient qu'une force motrice protonique élevée pendant l'état

respiratoire de repos 4 était potentiellement dangereuse pour la cellule en raison d'une production induite d'anion superoxyde. De même, l'ajout d'ADP en créant un état actif mitochondrial entraîne une oxydation accrue des transporteurs d'électrons. Cette oxydation provoque une réduction drastique de la production de FRO [84, 86, 89, 90]. Par l'utilisation d'inhibiteurs et d'agents découplants, de nombreux travaux ont identifié que les complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale étaient responsables de la production d' $O_2^{\cdot-}$ [84, 90, 91].

En effet, le complexe I catalyse la conversion de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde par le transfert d'un électron sur l'oxygène moléculaire. Expérimentalement, si le succinate est utilisé comme substrat du complexe I en l'absence de roténone, la production de $O_2^{\cdot-}$ est très importante, ce qui a permis d'identifier un flux inverse d'électrons du complexe II au complexe I. Ce flux inverse d'électrons est dû au fait qu'en absence d'ADP (état respiratoire 4), les électrons dérivés du succinate peuvent remonter au complexe I grâce au potentiel de membrane et ainsi réduire le NAD^+ en $NADH$ [92]. Il a été mis en évidence que le complexe I produit l'anion superoxyde sur la face matricielle de la membrane interne mitochondriale, l'anion superoxyde est « dismuté » en H_2O_2 par la SOD mitochondriale. Le H_2O_2 diffuse secondairement vers le cytoplasme à travers la membrane interne mitochondriale qui est fortement imperméable aux protons. Dans ce cas, un traitement par un mimétique de la SOD exogène n'aura pas d'effet [78]. En revanche, il a été mis en évidence que la production d'anion superoxyde au niveau du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale se réalisait sur la face cytoplasmique de la membrane interne [93]. Dans ce cas, la production de l' H_2O_2 se fera au niveau cytoplasmique permettant lors de l'ajout d'un mimétique de la SOD exogène d'augmenter la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$. La répartition des FRO au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale est résumée dans la figure 7.

Figure 7 : la répartition des FRO au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale d'après Beal et al. [94]

1.3.7.3 La modulation de l'activité mitochondriale

Les mitochondries génèrent des FRO à partir de différents centres d'oxydo-réduction dans la chaîne respiratoire et d'autres voies métaboliques [95]. Compte tenu du fonctionnement mitochondrial, la principale forme réactive générée par la mitochondrie est l' $O_2^{\cdot-}$, qui peut ensuite être converti en H_2O_2 ou $ONOO^-$ [96]. A un niveau de stress oxydant faible, l'activité mitochondriale des FRO joue un rôle dans la signalisation cellulaire. En revanche, à des niveaux plus élevés de FRO, les protéines et les lipides mitochondriaux sont susceptibles d'être oxydés [95, 97]. Compte tenu de la capacité de la mitochondrie à induire des FRO qui peuvent provoquer des dommages cellulaires pouvant conduire à la mort cellulaire, la modulation de l'activité mitochondriale représente depuis quelques années un axe majeur de recherche [98-101].

La production mitochondriale de FRO varie en fonction des tissus étudiés. Les tissus post-mitotiques comprenant l'ensemble des tissus musculaires et nerveux présentent la production mitochondriale de FRO la plus élevée [102]. Les axes de recherche portant sur la

régulation mitochondriale des FRO se sont principalement orientés vers le vieillissement cellulaire, les maladies neuro-dégénératives et les cellules cancéreuses [103-105].

A l'état de repos, la production mitochondriale de FRO est faible. La production de l' O_2^{\bullet} par une mitochondrie intacte de tissus post-mitotiques n'est quasiment pas détectable en présence de pyruvate/malate (fournissant du NADH) ou de succinate (fournissant du FADH₂) [78, 92]. En revanche, la production mitochondriale d' O_2^{\bullet} augmente de manière notable lorsque des inhibiteurs spécifiques du transfert d'électron sont utilisés : la roténone pour les substrats liés au NADH et l'antimycine A pour les substrats liés au FADH₂.

La production mitochondriale d' O_2^{\bullet} est liée au potentiel de membrane et au flux d'électrons à travers la chaîne de transport d'électrons (ETC). La membrane interne mitochondriale était initialement considérée comme complètement imperméable aux protons. Néanmoins, il a été rapporté que cette imperméabilité n'était pas absolue, permettant donc à une faible quantité de protons de retourner dans la matrice mitochondriale. Cette fuite de protons à travers la membrane est appelée *proton leak* [106, 107]. Le couplage oxydation-phosphorylation est donc perfectible et la composition lipidique de la membrane est un élément capital de la perméabilité aux protons [108, 109]. Outre une perméabilité basale aux protons très faible, il a été mis en évidence que la présence de protéines enchâssées dans la membrane mitochondriale peut accroître la perméabilité aux protons. Ces protéines découplantes ou uncoupling protein (UCP) permettent, en raison de leur fonctionnement, avec des transporteurs de protons, la dispersion de l'énergie liée au potentiel électrochimique.

La famille des protéines découplantes s'agrandit régulièrement et comporte des isoformes avec une expression tissulaire variable et des fonctions diverses. Ainsi, l'UCP2, qui a une expression ubiquitaire, et l'UCP3, qui est exprimée plus spécifiquement dans les tissus adipeux et le muscle squelettique, jouent un rôle plus spécifique dans la régulation de la production mitochondriale de FRO [110-112]. Certains auteurs [113, 114] avancent l'hypothèse selon laquelle le rôle du *proton leak* serait de réguler la production de FRO mitochondriales. Les UCP sont présents dans tous les organismes vivants bactériens, végétaux, et animaux. Dans des macrophages surexprimant l'UCP2 la production d' H_2O_2 est réduite [110]. L'inactivation du gène de l'UCP2 dans les macrophages de souris entraîne une augmentation de la production de FRO [115]. De plus, l'anion superoxyde active directement

l'UCP2 [116, 117]. De même, l'UCP3 présenterait aussi une activité régulatrice de la production de H_2O_2 mitochondriale [117, 118]. Ainsi des mitochondries provenant du tissu musculaire squelettique de souris présentant un gène de l'UCP3 invalide entraîneraient également une augmentation de la production de FRO [111, 112].

Il existe une autre cause de fuite protonique, le *slipping* ou *découplage intrinsèque*. Cette autre fuite de protons est la résultante d'un patinage enzymatique des différentes pompes à protons de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe I, III et IV). La pompe à protons est un système enzymatique qui catalyse la production d'un flux de protons. De cette façon, la fuite de protons peut ne pas entraîner la production d'ATP au niveau de l'ATP synthase d'où l'appellation *proton slipping* [119]. L'autre hypothèse serait qu'au niveau de la pompe à protons de la chaîne respiratoire mitochondriale, le passage d'électrons ne soit pas associé à un passage de protons ou *redox slipping* [120-123]. Il semble cependant que l'activité des pompes à protons soit un élément de régulation de l'efficacité de la chaîne respiratoire mitochondriale comme cela a principalement été rapporté au niveau de la cytochrome c oxydase (complexe IV) [124]. C'est cette modulation d'activité qui pourrait intervenir dans la régulation de la production mitochondriale de FRO [102].

1.3.7.4 L'effet des FRO sur la mitochondrie

La mitochondrie a depuis plusieurs décennies été identifiée comme l'une des principales sources de FRO intracellulaire. Néanmoins, dans le même temps, une augmentation des FRO aura également pour principale cible la mitochondrie. Les FRO peuvent avoir une action directe sur l'activité mitochondriale. L' $O_2^{\cdot-}$ peut réagir avec le monoxyde d'azote (NO) et produire l' $ONOO^{\cdot-}$. La chaîne respiratoire mitochondriale peut être inhibée par l' $ONOO^{\cdot-}$ [125] et endommager plusieurs composants mitochondriaux (complexe de la chaîne respiratoire, membrane, ADN...) [126, 127]. L'ADN mitochondrial (ADNmt) est un des premiers atteints car il est à proximité directe de la source de production, en raison de sa fixation à la membrane interne. L'ADNmt présente plusieurs caractéristiques qui fait de lui une cible de choix pour les FRO : il est fragile car dépourvu d'histones, et ne possède pas de système de réparation de l'ADN aussi efficace que celui de l'ADN nucléaire (ADNn) [128-131]. Les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sont codées en partie par l'ADNn et par l'ADNmt. Ainsi 13 sous-unités protéiques qui constituent l'ETC sont

codées par l'ADNmt (7 sous-unités du complexe I, une du complexe III, 3 du complexe IV, et 2 pour l'ATPsynthase). Une altération de l'ADNmt pourrait donc perturber le fonctionnement de la chaîne respiratoire et déclencher une cascade de réaction amenant à une augmentation de la production de FRO et à des dégâts au niveau principalement de la mitochondrie. De la même façon, une oxydation augmentée des phospholipides membranaires mitochondriaux pourrait modifier le fonctionnement mitochondrial et entraîner un niveau de FRO plus élevé [132, 133].

1.4 Les systèmes antioxydants

Les FRO produites constamment au cours du métabolisme aérobie sont éliminées par un arsenal de molécules qualifiées d'anti-oxydantes. Un antioxydant se définit comme toute substance qui, lorsqu'elle est présente à une faible concentration comparée à celle d'un substrat oxydable, retarde ou prévient significativement l'oxydation de ce substrat [5].

Cette définition inclut trois types de protéines :

- Les protéines qui vont catalyser des réactions aboutissant à éliminer des radicaux libres et autres molécules réactives. Il s'agit en particulier de la SOD, de la catalase, des glutathion peroxydases et des thiorédoxine peroxydases. L'activité de ces enzymes est finement régulée en fonction de l'état physiologique de la cellule.
- Les protéines qui minimisent la disponibilité de substances pro-oxydantes telles que le fer ou le cuivre qui sont nécessaires à la génération de radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Il s'agit en particulier de la transferrine et de la ferritine.
- Les molécules de bas poids moléculaires qui se lient aux radicaux libres et en diminuent la toxicité. Certaines sont endogènes comme le glutathion, d'autres proviennent de l'alimentation, tels que l'acide ascorbique (vitamine C) ou l' α -tocopherol (vitamine E).

Le tableau ci-dessous résume les différents systèmes antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques actuellement identifiés chez l'homme.

Tableau 3 : Les systèmes antioxydants chez l'homme [5]

Les systèmes enzymatiques	Les systèmes non enzymatiques
Elimination de l'anion superoxyde Les superoxydes dismutases	Elimination de l'anion superoxyde Les vitamines C et E Les flavonoïdes Les caroténoïdes L'ubiquinone (coenzyme Q ₁₀)
Elimination du peroxyde d'hydrogène Les peroxydases hémiques Catalase Les peroxydases non hémiques Glutathion peroxydases & glutathion réductase Peroxyrédoxines et thiorédoxine réductase Régulation intracellulaire de la concentration en fer libre Internalisation via les récepteurs à transferrine Stockage par la ferritine	Elimination du peroxyde d'hydrogène Les vitamines C et E Le glutathion (GSH) La thiorédoxine

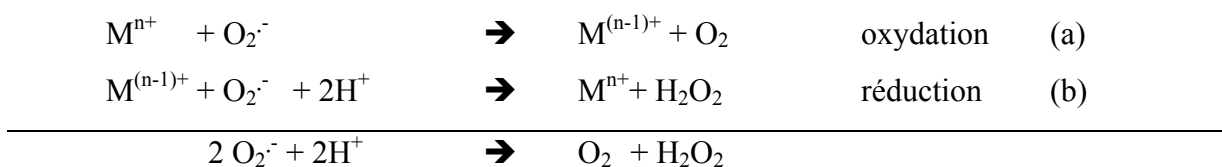
1.4.1 La superoxyde dismutase ou SOD

La SOD catalyse la dismutation de deux anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène:



Cette réaction peut s'effectuer spontanément, mais la SOD l'accélère environ 10 000 fois[5].

Il existe plusieurs SOD qui ont toutes la propriété d'être liées à un métal, le cuivre, le zinc ou le manganèse, qui va servir au transfert d'électron :



M représentant la métalloenzyme, M^{n+} à l'état oxydé et $\text{M}^{(n-1)+}$ à l'état réduit.

Trois sortes de SOD ont été identifiées dans la cellule eucaryote:

➤ La SOD1 à cuivre et à zinc (Cu-ZnSOD) que l'on retrouve principalement dans le cytosol. Le cuivre (Cu^{2+}) est nécessaire à l'activité catalytique de la SOD1, tandis que le zinc aide uniquement à la stabilisation de l'enzyme.

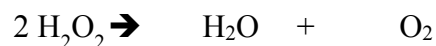
➤ La SOD2 à manganèse (MnSOD) siège au niveau de la matrice mitochondriale. Elle occupe une place centrale dans la détoxification de $\text{l'O}_2^{\bullet-}$ puisque, dans les conditions physiologiques, 90% des anions superoxydes sont produits au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. La SOD2 est un homo-tétramère. Chaque sous-unité comporte un atome de manganèse (Mn^{3+}) indispensable à l'activité catalytique.

➤ La SOD3 ou EC-SOD, à cuivre et à zinc est une protéine sécrétée et présente principalement dans le milieu extracellulaire [134, 135]. Elle est présente dans les espaces interstitiels ainsi que dans le plasma, la lymphe, et le liquide synovial [136]. La EC-SOD est une des enzymes antioxydantes extracellulaires prédominantes et son rôle est central dans la détoxification de l'anion superoxyde extracellulaire [137].

Les SOD jouent donc un rôle majeur dans l'élimination de l'anion superoxyde produit par le métabolisme aérobie et aussi par la NADPH oxydase ou les cytochromes P450. Leur importance est illustrée par les souris "knock-out". Les souris déficientes pour le gène de la SOD2 présentent dès les premiers jours de vie une atteinte neuronale et myocardique sévère [138]. Les souris déficientes pour la SOD1 présentent un phénotype moins sévère caractérisé par une atteinte neurologique tardive [139]. Chez l'homme, une mutation du gène de la SOD1 est associée à la forme familiale de la sclérose latérale amyotrophique [140]. Cependant, l'effet protecteur de la SOD est conditionné par la possibilité pour la cellule d'éliminer efficacement le peroxyde d'hydrogène, produit par la SOD, et lui même toxique [141]. L'effet de la SOD ne doit donc pas être envisagé isolément mais en fonction de l'activité d'autres enzymes chargées d'éliminer le peroxyde d'hydrogène, principalement la catalase et la glutathion peroxydase.

1.4.2 La catalase

La catalase catalyse directement la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène :



Structure

La catalase fonctionnelle est composée de quatre sous-unités identiques, chacune contenant un noyau hème et fixant une molécule de NADPH [142]. La plupart des catalases existe en tant que tétramères de 60 ou 75 kDa. Chaque sous-unité contient un groupe hème correspondant au site actif enfoui à l'intérieur de la structure, mais accessible à partir de la surface par des canaux hydrophobes. La structure stable des catalases la rend très résistante au pH acide, à la dénaturation thermique et à la protéolyse contrairement à la plupart des autres enzymes. L'aminotriazole inhibe spécifiquement la catalase en se fixant sur le noyau hème [143]. La voie d'accès la plus évidente à l'emplacement distal de l'hème est similaire à celles présentes dans la voie d'accès peroxydases [144].

Distribution

Elle est exprimée par la plupart des cellules de l'organisme mais est particulièrement concentrée dans le foie [5]. Au niveau subcellulaire, elle est principalement localisée dans les peroxysomes et n'est pas, ou très peu, présente dans les mitochondries. Les faibles conséquences cliniques du déficit héréditaire en catalase suggèrent que celle-ci n'est pas indispensable à l'élimination du peroxyde d'hydrogène produit par les cellules dans les conditions normales [145].

Mécanisme d'action

L'hème contenu au sein des catalases décompose le peroxyde d'hydrogène par un mécanisme en deux étapes dans lequel le peroxyde d'hydrogène s'oxyde et réduit le fer héminique dans le site actif. Dans la première étape, une molécule de peroxyde d'hydrogène oxyde l'hème en une espèce oxyferryl. Dans la seconde étape, une seconde molécule d'hydrogène peroxyde est utilisée comme agent réducteur pour régénérer l'enzyme, la production d'eau et d'oxygène. Des catalases contiennent également le NADPH comme co-facteur qui sert à empêcher la formation d'un composé inactif. Ainsi les catalases peuvent également entraîner une production de FRO (figure 8). La NADPH peut jouer un rôle en

fournissant les électrons nécessaires pour réduire l'oxygène moléculaire à la production de FRO.

Figure 8 : Place de la catalase dans la production de FRO. [146]

1.4.3 Les glutathion peroxydases et le glutathion

Les glutathion peroxydases (GPx) catalysent la décomposition du peroxyde d'hydrogène en couplant sa réduction en H₂O avec l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en bisulfure de glutathion (GSSG):



1.4.3.1 Les glutathion peroxydases

Outre le peroxyde d'hydrogène, les GPx peuvent réduire de nombreux peroxydes tels que les hydroperoxydes lipidiques (ROOH) transformés en groupement alcool (ROH) [5]. Le GSH reste toujours le donneur d'hydrogène. Les GPx sont composées de quatre sous-unités,

chacune contenant un atome de sélénium essentiel à l'activité enzymatique. Chez l'homme quatre iso-enzymes numérotés de 1 à 4 ont été identifiés [136]. Les GPx sont majoritairement localisées dans le cytoplasme. Une proportion plus faible est présente dans la matrice mitochondriale. Les mitochondries sont dépourvues des enzymes nécessaires à la synthèse du GSH qui doit donc être importé du cytoplasme. La plus grande partie du peroxyde d'hydrogène produit au niveau des mitochondries ou du cytoplasme est éliminé par les GPx plutôt que par la catalase [3, 5].

1.4.3.2 Le glutathion

Structure

Le glutathion (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine ; GSH) est un tripeptide formé par l'association de L-glutamate, de L-cystéine, et de L-glycine. Il contient un groupement thiol (-SH) au niveau du résidu cystéine qui possède un fort pouvoir réducteur. Les deux tiers du glutathion libre est sous la forme réduite GSH [147]. Les chaînes latérales de sulfhydryle provenant des résidus de cystéine au niveau de molécule de glutathion peuvent former une liaison disulfure (GSSG) au cours de l'oxydation lors de réactions avec des oxydes et peroxydes dans les cellules. La réduction de la GSSG en deux molécules de GSH est effectuée par la glutathion réductase, une enzyme qui nécessite l'oxydation couplée de NADPH [148].

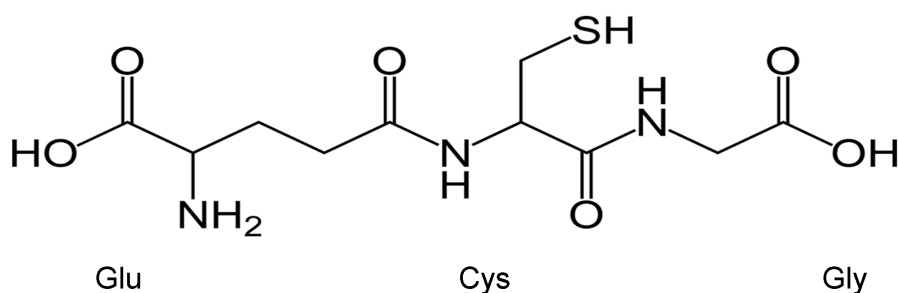
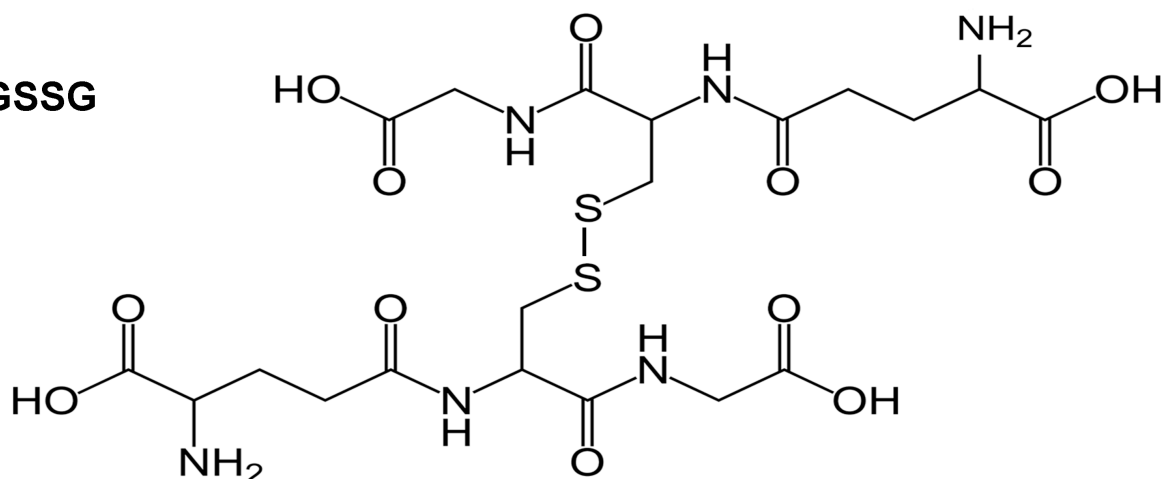
GSH**GSSG**

Figure 9 : Structure de la GSH et de la GSSG.

Le groupement thiol de la cystéine au sein de la GSH joue un rôle dans la réduction des thiols oxydés. L'oxydation des thiols par 2 cystéines forme un pont disulfure. Bien que ce lien joue un rôle important dans la structure des protéines et de leur fonction, les disulfures introduits de façon inappropriée peuvent être préjudiciables. Le glutathion peut réduire les ponts disulfures non enzymatiques. L' H_2O_2 produit lors d'un stress oxydant peut être réduit par le glutathion pour produire de l'eau et de l'oxygène [149].

Distribution

Le glutathion est présent dans pratiquement toutes les cellules, souvent à des concentrations élevées (0,1-10 mM) [148].

Synthèse

Le GSH est synthétisé à partir du L-glutamate, de la L-cystéine, et de la L-glycine par l'action consécutive de la γ -glutamyl cysteine synthétase puis de la GSH synthétase au cours de deux réactions ATP dépendantes [150]. La première réaction est limitante et subit un

rétrocontrôle négatif par le GSH formé. Toutefois, lorsque le GSH est consommé, le rétrocontrôle négatif n'opérant plus, la disponibilité en L-cystéine devient alors le facteur limitant [151]. La synthèse du GSH peut être bloquée par le buthionine sulfoximine (BSO) qui inhibe la γ -glutamyl cysteine synthétase. La N-acetyl-cystéine (NAC) est un précurseur du glutathion qui présente l'avantage d'une meilleure pénétration intracellulaire, favorisant son utilisation en thérapeutique. Elle augmente l'activité de la GSH-reductase mais également de la catalase [152].

Figure 10 : La biosynthèse et la dégradation du GSH d'après Lomaestro et coll [150]

Pour maintenir un ratio GSH / GSSG élevé, la forme oxydée du glutathion (GSSG) est réduite en GSH par la glutathion réductase (GR). Le NADPH est le cofacteur de cette réaction:



Fonctions biologiques

Outre son rôle de co-facteur des GPx, le GSH réduit est impliqué dans de nombreux autres processus métaboliques, en particulier :

- La détoxification directe des FRO : le GSH peut réagir avec de nombreuses formes réactives de l'oxygène telles que $\text{OH}\cdot$ ou HOCl . Cette réaction génère un radical thiyl ($\text{GS}\cdot$) qui peut se dimériser pour former le bisulfure de glutathion - GSSG. Celui est alors régénéré en GSH par la GSH réductase [153, 154].
- Le métabolisme de certains xénobiotiques : le GSH peut se conjuguer à des molécules électrophiles. Cette réaction est catalysée par les glutathion S-transférases (GST) [153].

Figure 11 : Action de la GSH et de la GSSG selon Liu et al. [149]

La GSH réduit le H_2O_2 et le peroxyde lipidique(ROOH) par le biais de la glutathion peroxydase(GPx) par catalyse. Le GSSG formé est ensuite réduit en GSH par la glutathion réductase (GR), réaction catalysée par la consommation de NADPH. Le GSH joue également un rôle crucial dans la signalisation des protéines redox par la glutarédoxine (GRX) et les réactions catalysées par la sulfi-redoxine (SRX). Au cours d'un stress oxydant, les résidus cystéine de protéines, en particulier ceux dans forme thiolate (Cys-S^-), peuvent être oxydés en sulfénique (RSOH), sulfinique (RSO_2H) et en acide sulfonique (RSO_3H), en fonction de l'intensité du stress oxydant. Bien que la conversion de la forme acide sulfonique en l'acide sulfinique soit considérée comme irréversible, celui-ci peut être réduit en acide sulfénique à travers une réaction de catalyse (Srx). L'acide sulfénique réagit ensuite avec du glutathion pour former des disulfures mixtes de protéines (glutathionylation), qui peut être réduit pour libérer une forme -thiol (deglutathionylation) en utilisant du glutathion Srx comme agent réducteur.

1.4.4 Les peroxyrédoxines et la thiorédoxine

Les peroxirédoxines (Prx) forment une famille de peroxydases à groupement thiol capables de réduire le peroxyde d'hydrogène et d'autres peroxydes [153-155]. Elles ont en commun de posséder un résidu cystéine à leur extrémité N terminale qui va être le site primitif d'oxydation par le peroxyde d'hydrogène :



La Prx oxydée réagit alors avec une autre molécule de Prx-SH pour former un pont disulfide :



Le dimère disulfide est finalement régénéré en Prx réduite en oxydant une molécule contenant deux groupements thiols adjacents, la thioredoxine (TRx) :



Les deux groupements thiols de la TRx forment alors un pont disulfide qui est réduit par la thioredoxine réductase en utilisant comme donneur d'électrons le NADPH :



Il existe six isoformes de PRx localisés principalement dans le cytoplasme et les mitochondries. Leur activité catalytique est plus faible que celle de la catalase ou des GPx mais elles possèdent une forte affinité avec le peroxyde d'hydrogène. Les PRx pourraient ainsi être plus efficaces pour éliminer des niveaux faibles de peroxyde d'hydrogène [155].

1.5 Les effets biochimiques du stress oxydant

Le déséquilibre entre les systèmes de défense et de production de FRO en faveur de ces derniers entraîne un stress oxydant. Les FRO présents en excès provoquent des dommages cellulaires irréversibles en réagissant avec l'ADN, les lipides et les protéines. Le stress oxydant est un phénomène permanent, lié principalement au métabolisme aérobie responsable d'une production mitochondriale d'anion superoxyde. Ainsi, les FRO sont responsables quotidiennement de la formation d'environ 10^5 lésions sur l'ADN de chaque cellule [156]. La

principale conséquence biologique du stress oxydant est la mort cellulaire. Il est ainsi impliqué dans les processus de vieillissement ainsi que dans un grand nombre de pathologies dégénératives. Les modifications intracellulaires provoquées par les FRO peuvent également participer à la transformation et à la progression tumorale.

1.5.1 L'action sur l'ADN

Les principaux dommages médiés par le stress oxydant sont l'oxydation des bases, la création de sites abasiques, les cassures simple ou double brins, les pontages ADN-protéines et les adduits intra-caténaires [157]. Les FRO les plus réactives vis à vis de l'ADN sont le radical hydroxyle et le peroxydinitrite [158]. En revanche, l'anion superoxyde ne réagit pas directement avec l'ADN [159]. Un grand nombre des lésions provoquées sur l'ADN sont mutagènes, c'est à dire qu'elles peuvent entraîner des modifications permanentes du patrimoine génétique.

Figure 12: Actions des FRO sur l'ADN d'après Favier (<http://ist.inserm.fr>)

L'oxydation des bases et création de sites abasiques

Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'oxydation du carbone 8 de la guanine par le radical hydroxyle, entraînant la formation de 8 oxo-guanine, est la lésion la plus fréquente [160]. La détection des 8 oxo-guanine est d'ailleurs fréquemment utilisée comme marqueur du stress oxydant. Le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique [161].

Cassures de brins et pontages ADN-protéines

Le stress oxydant peut aussi s'attaquer au sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. L'attaque d'un radical hydroxyle sur le désoxyribose, ou au niveau des bases puriques ou pyrimidiques, peut entraîner une cassure du brin ou la formation de pontages covalents ADN-ADN ou ADN-protéine [162, 163].

Dommages indirects

Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque par des aldéhydes mutagènes provenant de la peroxydation des lipides : ils forment des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine (MDA: malone dialdéhyde), ou empêche la réparation des lésions de l'ADN [164]. L'attaque radicalaire des protéines qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) [165] ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), entraîne des pontages des protéines sur des bases de type lysine-guanine.

Sensibilité particulière de l'ADN mitochondrial au stress oxydant

L'ADN mitochondrial est particulièrement exposé au stress oxydant du fait de la production *in situ* continue de FRO par la chaîne respiratoire [77]. De plus, un même stress oxydant induit 3 à 10 fois plus de dommages à l'ADN mitochondrial qu'à l'ADN nucléaire [166]. Plusieurs raisons ont été évoquées :

- les capacités de réparation de l'ADN mitochondrial sont plus limitées que pour l'ADN nucléaire. En particulier, le système de réparation par excision de nucléotides qui permet l'exérèse des adduits est absent des mitochondries [167].

- la concentration élevée en fer dans les mitochondries facilite la formation de radical hydroxyle à partir du peroxyde d'hydrogène (réaction de Fenton) [167].

- l'ADNmt n'est pas protégé par les histones [168].

Enfin, du fait de l'absence d'introns, toute mutation sur l'ADN mitochondrial est susceptible d'altérer la séquence codante d'un gène et d'entraîner des conséquences biologiques [169].

1.5.2 L'action sur les lipides : la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique correspond à la réaction entre les FRO et les lipides. Elle concerne principalement les acides gras polyinsaturés ou PUFAs (Poly Unsaturated Fatty Acid) qui sont des constituants majeurs des membranes cytoplasmiques et mitochondriales.

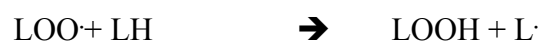
La peroxydation lipidique des PUFAs se subdivise en trois phases : initiation, propagation et terminaison.

- Initiation:



L'attaque par le radical hydroxyle d'un acide gras polyinsaturé (LH) conduit à la formation d'un radical lipidique (L·). Il est possible que d'autres radicaux puissent également initier la peroxydation lipidique, en particulier le peroxyde d'hydrogène et l'anion peroxynitrique (ONOO-) [153].

- Propagation:



Le radical lipoperoxyde (LOO·) réagit avec un autre acide gras polyinsaturé ce qui engendre simultanément un hydroxylipoperoxyde (LOOH) et un nouveau radical L· assurant ainsi la propagation du processus. Chaque radical lipidique (L·) est à l'origine d'une centaine de molécules d'hydroxylipoperoxyde (LOOH).

- Terminaison:



La phase de terminaison consiste en la formation de composés stables issus de la rencontre de deux espèces radicalaires. Cette phase ne survient qu'après un certain temps car la probabilité de rencontre entre deux radicaux libres est beaucoup plus faible que celle entre radical libre et acides gras polyinsaturés (leurs concentrations étant de très loin supérieures).

Conséquences de la peroxydation lipidique

- Transformation des radicaux LOO[•] en aldéhydes: la plupart de ces aldéhydes sont très réactifs. Ils augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres. Parmi eux on peut citer le malone-dialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonénal (4-HNE) [170]. Le MDA et dans une moindre mesure l'HNE sont mutagènes par formation d'adduits avec l'ADN [153].

- Induction de l'apoptose par peroxydation des membranes mitochondriales: la peroxydation entraînerait une augmentation de la perméabilité des membranes mitochondriales, provoquant la chute du potentiel membranaire mitochondrial et la translocation du cytochrome c dans le cytoplasme [171].

1.5.3 L'action sur les protéines

1.5.3.1 L'altération de la chaîne principale

Elle est due principalement au radical hydroxyle. Le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde ne réagissent pas directement avec la chaîne principale [159]. La réaction conduit à la suppression d'un atome d'hydrogène au niveau du carbone- α et à la formation d'un radical C[•]. Ce radical peut alors réagir soit avec l'oxygène moléculaire pour donner un radical peroxy et conduire à la fragmentation de la protéine [172] soit avec un autre carbone radicalaire pour former un pontage covalent intra ou intermoléculaire [173]. Ce type d'altération concerne potentiellement toutes les protéines et aboutit généralement à leur inactivation irréversible.

1.5.3.2 Les altérations de la chaîne latérale

Elles peuvent concerner les résidus aliphatiques (lysine, arginine), aromatique (tyrosine) et soufrés (méthionine, cystéine). Seuls ces derniers seront détaillés compte tenu de leur importance fonctionnelle.

La Méthionine (Met) et la Cystéine (Cys) qui contiennent des résidus soufrés sont les deux acides aminés les plus sensibles à l'oxydation, en particulier par le peroxyde d'hydrogène. Le groupement sulfhydryl (SH) de la cystéine peut être oxydé en groupement sulfenic (-SOH), sulfinic (SO₂H) ou sulfonic (SO₃H) [20]. Deux résidus cystéines oxydés peuvent former un pont disulfide qui va altérer la conformation de la protéine et modifier son éventuelle activité enzymatique [20]. La cystéine est en effet retrouvée au niveau du site actif de nombreux enzymes. Les enzymes les plus sensibles à l'oxydation induite par le peroxyde d'hydrogène sont les protéines tyrosine-phosphatases (PTP). Celles-ci jouent un rôle essentiel dans la transmission du signal intracellulaire. Il a ainsi été montré qu'une concentration faible de peroxyde d'hydrogène pouvait induire une inactivation spécifique de PTEN par formation d'un pont disulfide au niveau de son site enzymatique [174]. L'inactivation de PTEN conduit à l'activation dérégulée de la kinase AKT et ainsi à l'amplification d'un message de survie cellulaire et de prolifération. Cette inactivation de PTEN est réversible : sa réduction par la thiorédoxine permet la restauration de son activité. A l'inverse, les FRO sont capables d'activer la protéine kinase C en provoquant la formation d'un pont disulfide au niveau de l'extrémité N-terminale riche en cystéine et jouant un rôle inhibiteur sur l'activité de la protéine [175].

Le fait que la sensibilité des protéines au stress oxydant ne soit pas uniforme explique que des effets biologiques opposés puissent s'observer en fonction du type de FRO et des concentrations utilisées. Un stress oxydant massif induira la mort cellulaire en provoquant des lésions multiples sur l'ADN, les protéines et les lipides. A l'inverse, une augmentation plus modérée de la concentration de peroxyde d'hydrogène peut amplifier un message de survie cellulaire et de prolifération en modulant spécifiquement l'activité de quelques protéines hypersensibles. Le tableau 4 fait la liste de quelques-unes d'entre elles.

Tableau 4: Quelques protéines hypersensibles au stress oxydant

Principales protéines	Conséquences biologiques potentielles
Inactivation de protéine tyrosine phosphatases:	
- PTEN	- Activation d'AKT : survie cellulaire, prolifération [174]
- MAP kinase phosphatases (MKP)	- Activation de MAP kinase : prolifération [176]
- PTP 1B	- Effet mitogénique [177, 178]
- Src homology region 2 domain-containing phosphatases 1 et 2 (SHP- 1 et 2)	- Prolifération, survie cellulaire des lymphocytes B (inactivation de SHP-1 décrite dans la leucémie à tricholeucocytes) [179, 180]
Activation de sérine-thréonine kinase:	
- Protéine kinase C	- Prolifération cellulaire [175]

En conclusion de ce chapitre, les formes réactives de l'oxygène peuvent être considérées comme de véritables seconds messagers intracellulaires [41] car:

- leur production peut être régulée en réponse à un agoniste: c'est le cas de l'anion superoxyde produit par la NADPH oxydase après stimulation par différents facteurs de croissance.
- ils peuvent être éliminés par différentes voies cataboliques, permettant l'extinction du signal intracellulaire.
- il existe des protéines cibles dont la fonction peut être altérée de façon réversible par une augmentation du stress oxydant.

Cette notion permet d'envisager qu'une dérégulation du signal transmis par les FRO puissent participer à l'oncogénèse. Elle permet aussi d'envisager des applications thérapeutiques anti-tumorales par une modulation pharmacologique du stress oxydant intracellulaire.

2. L'implication du stress oxydant dans l'oncogénèse

2.1 L'augmentation du stress oxydant dans les cellules tumorales

Il est actuellement reconnu que la majorité des tumeurs malignes présente une augmentation de la concentration intracellulaire de FRO, comparativement aux tissus non tumoraux [181, 182]. Ceci a été démontré aussi bien dans des lignées tumorales établies [183, 184] que dans les tumeurs primaires [185], en particulier pour l' $O_2^{\bullet-}$ et l' H_2O_2 . Des signes indirects d'une augmentation du stress oxydant ont également été mis en évidence. Ainsi, il a été observé chez des patients atteints de diverses tumeurs (rein, sein, colon, rectum, cerveau, lymphomes) une augmentation des taux de produits oxydés de l'ADN (8-oxo-G, 8-oxo-dG) et des produits de peroxydation lipidique [186]. Cette augmentation du stress oxydant semble être à la fois la conséquence et une des causes de l'acquisition du phénotype malin :

- le stress oxydant comme conséquence de la transformation maligne : une augmentation de l'index mitotique, fréquemment observée dans les cellules malignes comparativement aux cellules saines, a pour conséquence une augmentation d'activité de la chaîne respiratoire et donc une augmentation de la production d' $O_2^{\bullet-}$. Ainsi, l'exposition à une concentration physiologique d'androgène de la lignée de cancer de prostate LNCaP est responsable d'une augmentation de l'indice de prolifération qui s'accompagne d'une augmentation de l'activité mitochondriale, de la consommation en oxygène et de la production de FRO [187].
- le stress oxydant comme cause de la transformation maligne : il a été mis en évidence expérimentalement qu'un stress oxydant prolongé peut être responsable de la transformation maligne. *In vitro*, l'exposition prolongée au peroxyde d'hydrogène de cellules épithéliales non malignes provoque leur transformation [188, 189]. Des souris déficientes pour le gène de la SOD1 ont un développement normal mais présentent un risque accru de cancer du foie. Des mutations spécifiques du stress oxydant apparaissent au niveau du foie avec une fréquence supérieure aux souris témoins dès le 3^e mois de vie [190]. Des souris déficientes pour les gènes des GSH peroxydases 1 et 2 présentent un risque accru de cancer colique [191]. Chez l'homme, a également été mis en évidence une corrélation entre l'activité constitutionnelle de deux enzymes anti-oxydantes et le risque de cancer : les personnes porteuses d'un

polymorphisme de la Gpx 1 associé avec une diminution d'activité de l'enzyme présentent un risque accru de cancers du poumon [192], du sein [193] et de la vessie [194]. De même un polymorphisme du gène de la SOD2 responsable d'une moindre pénétration de la protéine dans les mitochondries est associé à un risque accru de cancer du sein [195].

Le stress oxydant est impliqué à différentes étapes de l'oncogénèse par deux grands types de mécanisme : l'effet mutagène (ou « génétique ») et le rôle de second messenger dans la transmission de signaux intracellulaires (ou « l'effet épigénétique »). Dans la suite de ce chapitre, nous verrons que les FRO sont capables de transmettre des signaux mitogènes, de survie cellulaire ou encore stimulant l'invasion tumorale et l'angiogénèse. Ainsi, transformation maligne et FRO sont liés par une relation en boucle qui conduit conjointement à l'acquisition progressive du phénotype malin et à l'augmentation du stress oxydant (figure 13).

Figure 13 : FRO et transformation maligne

2.2 Les effets mutagènes des formes réactives de l'oxygène

Comme détaillé dans le chapitre précédent, les FRO peuvent induire des modifications du patrimoine génétique à la fois par un effet direct sur l'ADN et par la génération d'aldéhydes mutagènes lors de la peroxydation des lipides.

2.2.1 Le rôle dans l'initiation tumorale

L'effet mutagène des FRO peut être responsable d'un effet initiateur sur l'oncogénèse en induisant une mutation non létale qui va procurer un avantage sélectif à la cellule. Ainsi, un stress oxydant chronique semble jouer un rôle de premier plan dans la survenue d'un certain nombre de cancers chez l'homme :

- Plusieurs carcinogènes exogènes induisent la transformation cellulaire au moins en partie via la génération d'un stress oxydant intracellulaire. C'est en particulier le cas de métaux tels que le fer (carcinome hépatocellulaire), le chrome hexavalent, le cobalt et l'arsenic (cancer du poumon) [153, 154]. L'induction de cancers par l'exposition aux fibres d'amiante semble également en rapport avec la production de FRO. Dans ce cas, le stress oxydant semble lié à la réaction inflammatoire au contact des fibres d'amiante et à l'accumulation associée de fer [196, 197]. L'effet carcinogène de l'alcool éthylique pourrait également impliquer des FRO produits lors de son métabolisme par le cytochrome P450 [198]. Enfin, plusieurs substances issues de la combustion du tabac ont un effet pro-oxydant qui pourrait contribuer à leur effet carcinogène [199].

- L'inflammation chronique : au cours du processus inflammatoire, des FRO et des formes réactives de l'azote sont produites par les polynucléaires et les macrophages et jouent un rôle majeur dans le développement d'une tumeur maligne [200]. L'inflammation chronique, d'origine infectieuse ou non, est responsable d'un cas de cancer sur quatre dans le monde [200]. Parmi les pathologies inflammatoires associées avec un risque de cancer le plus élevé, on peut citer : l'hémochromatose, les colites inflammatoires, les hépatites virales, les infections à *Helicobacter Pylori*, la bilharziose et l'œsophagite de Barrett [200]. Au cours de l'hémochromatose, les lésions entraînées par les FRO via l'inflammation chronique sont

aggravées par l'accumulation du fer qui favorise la transformation de l'anion superoxyde en radical hydroxyle hautement réactif (réaction de Fenton) [200]. Chez des souris transgéniques pour le génome du virus HBV a été mise en évidence une accumulation progressive de lésions de l'ADN induites spécifiquement par le stress oxydant [201].

2.2.2 Le rôle du stress oxydant dans la progression tumorale

La concentration accrue de FRO dans les cellules tumorales va conduire à augmenter les dommages à l'ADN. Il a été retrouvé une relation entre une concentration élevée de FRO dans les cellules tumorales et une fréquence accrue de mutations, aussi bien au niveau de l'ADN nucléaire que mitochondrial [202]. Il est ainsi admis que le stress oxydant participe à l'instabilité génomique, caractéristique essentielle des tumeurs malignes [203].

2.3 Transmission de signaux intracellulaires par les FRO favorisant le développement tumoral

2.3.1 La prolifération et la survie cellulaire

2.3.1.1 L'augmentation de la prolifération de lignées tumorales par les FRO

L'ajout au milieu de culture de faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène (moins de 1 μ M) augmente la prolifération de lignées immortalisées ou transformées [204-206]. A l'inverse, de fortes concentrations d'antioxydants telles que la NAC (20-100mM) ou la catalase peuvent dans certains modèles réduire la prolifération tumorale [207-210] et induire une apoptose [211]. De ces constatations, il semble clair que de faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène sont nécessaires à la prolifération, et dans une moindre mesure, à la survie des cellules tumorales.

2.3.1.2 Les mécanismes

L'effet stimulant des FRO sur la prolifération et la survie des cellules tumorales semble principalement lié à leur effet inhibiteur de l'activité de plusieurs phosphatases,

conduisant à l'activation de multiples voies de transmission du signal et finalement de facteurs de transcription nucléaires :

La voie de la PI3 kinase et AKT

L'inactivation de la phosphatase PTEN par le peroxyde d'hydrogène induit l'augmentation de la concentration du phosphatidylinositol tri-phosphate (PtdIns(3,4,5)P₃) et l'activation d'AKT [212]. Dans deux lignées de cancer du pancréas, la phosphorylation d'AKT est dépendante des FRO. Dans ce modèle, l'effet anti-apoptotique des FRO nécessite la phosphorylation et l'activation d'AKT [213].

La voie des MAP kinases (Mitogen Activated Protein)

Les MAP kinases sont des sérine-thréonine kinases dont on distingue quatre familles : ERK (extracellular-regulated kinases), JNK (c-Jun-NH₂-terminale kinases), p38 MAPK et B (big) – MAPK-1. Les MAPK relaient des signaux générés par des stimuli endogènes ou exogènes (facteurs de croissance) vers le milieu intracellulaire via des phosphorylations successives. En fonction du contexte et du type de MAPK mis en jeu, ces signaux peuvent être mitogéniques, de survie cellulaire ou au contraire pro-apoptotique [153]. La voie ERK joue un rôle important dans la croissance et la différenciation cellulaire en réponse aux facteurs de croissance [214]. A l'inverse, les JNKs et p38 MAPK ont été décrites comme ayant un effet pro-apoptotique et ont été dénommées « Stress Activating Protein Kinase » (SAPK, figure 14) [215]. En fait, il semble qu'en dehors de situations de stress, les SAPK aient plutôt un effet pro-prolifératif, anti-apoptotique et oncogénique [216, 217].

Figure 14: Voies des SAPKs (Stress Activating Protein Kinase) d'après Davis et coll.[215]

L'activation des MAPK par les facteurs de croissance fait intervenir la production de FRO. Ainsi la fixation du PDGF sur son récepteur induit dans les cellules musculaires lisses vasculaires une activation des MAPK et une augmentation de l'indice mitotique qui est dépendant d'une augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène [59]. Dans plusieurs modèles, de faibles concentrations ou des niveaux élevés mais transitoires de FRO induisent la prolifération des cellules normales par l'activation de la voie ERK [204, 218-221]. Récemment, il a été montré que de faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène induisaient l'expression des formes actives des kinases ERK1/2 et p38 dans des cellules épithéliales mammaires en même temps que leur transformation [189].

Les MAPK régulent l'activité de plusieurs facteurs de transcription en particulier ceux de la famille AP-1. Les facteurs de transcription AP-1 sont formés par la dimérisation de protéines de la famille de c-Jun, Fos ou Maf. Les protéines AP-1 activées induisent en particulier la prolifération mais elles peuvent également agir comme régulateurs positifs ou

négatifs de l'apoptose. Le peroxyde d'hydrogène induit l'activation de protéines AP-1 par un mécanisme dépendant des MAPK [187, 222]. L'activation d'AP-1 s'est montrée indispensable à l'effet oncogénique des FRO [223]. L'activation des MAPK par le stress oxydant pourrait se faire en particulier par l'inhibition de MAPK phosphatases [176] mais également par l'activation de la protéine kinase C [153].

2.3.2 L'invasion tumorale

L'exposition pendant quelques jours au peroxyde d'hydrogène de cellules épithéliales mammaires non tumorales induit l'acquisition d'un phénotype invasif marqué par l'interruption des contacts intercellulaires, la relocalisation de la E-cadherine et une activité accrue de plusieurs matrix métallo-protéinases (MMP) [189]. L'activation des voies des MAPK (ERK1/2 et p38) et de la PI3 kinase a été impliquée dans cette modification phénotypique [224].

2.3.3 L'angiogénèse

Un effet angiogénique des FRO produits par les cellules tumorales a été pour la première fois suggéré par Arbiser et coll. en 2002 [225]. La lignée de cancer de prostate DU145 transfectée par le gène de la NOX 1 présente une production de peroxyde d'hydrogène multipliée par 10. L'indice de prolifération est peu augmenté *in vitro* mais la tumorigénicité est très augmentée chez la souris nude suggérant un effet sur l'angiogénèse tumorale. Les tumeurs transgéniques présentent une augmentation de la densité vasculaire et de la production de VEGF. Le rôle du peroxyde d'hydrogène dans l'acquisition du phénotype angiogénique est fortement suggéré par le fait que la transfection du gène de la catalase est associé à une diminution de la production de VEGF et de la tumorigénicité.

Les mécanismes liant production de FRO et expression accrue du VEGF et angiogénèse restent cependant à être précisés. Il a été montré que de faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène induisent une augmentation de l'expression de la protéine HIF-1 α

(hypoxia inducible factor), facteur de transcription augmentant l'expression du gène du VEGF [226]. L'augmentation d'expression de HIF sous l'influence d'un stress oxydant pourrait avoir plusieurs origines : une inhibition des hydroxylases chargées de la dégradation de HIF et une inhibition de phosphatases telles que PTEN et les MAPK phosphatases, qui régulent négativement l'expression de HIF [227, 228].

Il est possible également que les FRO amplifient l'effet de HIF sur l'expression du gène du VEGF en facilitant certaines interactions ADN-protéines. Il a en effet été montré sur des cellules endothéliales qu'un stress oxydant induit par une activation de la NADPH oxydase provoque l'altération d'une guanosine située au niveau du promoteur du gène du VEGF. Cette altération spécifique est responsable d'une augmentation de l'expression du VEGF en favorisant l'interaction HIF - promoteur [229].

2.4 Les mécanismes du stress oxydant au cours du cancer

Le degré de stress oxydant dans une cellule dépend de l'équilibre dynamique entre la génération et l'élimination des FRO. Ainsi, l'augmentation de la concentration des FRO intracellulaire au cours du cancer peut être due à deux types de mécanismes, éventuellement associés :

- un excès de production, essentiellement par les deux voies principales de genèse de l'anion superoxyde : la chaîne respiratoire mitochondriale et la NADPH oxydase. Ce mécanisme paraît prépondérant.
- une diminution des capacités de d'élimination des FRO par les systèmes antioxydants.

2.4.1 L'accroissement de la production des FRO au cours du cancer

2.4.1.1 L'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase

Le rôle de la NADPH oxydase dans la progression tumorale a pour la première fois été suggéré par Suh et coll. en montrant que la transfection du gène de la NOX1 dans des cellules NIH 3T3 s'associe à l'acquisition d'un phénotype transformé [230]. Le rôle du peroxyde d'hydrogène dans cette transformation est confirmé par la co-transfection du gène de la catalase qui permette de reverser le phénotype des cellules NOX1 (+) [208]. Par la suite, de

nombreuses études ont permis de retrouver une expression des isoformes 1, 4 et 5 de la NADPH oxydase dans des lignées établies et des tumeurs primaires du colon [231], de la peau [232, 233] du pancréas [211], de la prostate [210, 234] et dans des cellules de leucémie à tricholeucocytes [179]. Dans plusieurs de ces études, l'inhibition de la NOX s'associe à un ralentissement de la prolifération et à une augmentation de l'apoptose [179, 210, 211, 233]. On notera en particulier que l'inhibition de la NOX5 par le DPI dans des cellules de leucémie à tricholeucocytes s'accompagne d'une augmentation globale de l'activité intracellulaire tyrosine phosphatase et plus spécifiquement de la phosphatase SHP-1, qui possède un rôle inhibiteur sur la transduction du signal d'activation des lymphocytes B. Ainsi, l'activation de NOX5 dans les cellules de leucémie à tricholeucocytes semble participer à la transmission dérégulée d'un signal d'activation et de prolifération [179].

Mécanismes de l'hyperactivité des NADPH oxydases au cours du cancer

Dans la plupart des études réalisées sur des spécimens tumoraux, les NOX ne semblent pas être surexprimées par rapport au tissu sain correspondant [210, 231, 234]. Comme détaillé précédemment, l'activité des NOX fait l'objet d'une régulation fine et complexe. Il est donc concevable que leur hyperactivité au cours du cancer soit de mécanisme épigénétique. Le rôle de l'oncogène Ras dans l'activation des NOX est le mieux reconnu. Irani et coll. ont ainsi montré que la transformation de fibroblastes 3T3 par transfection d'une forme mutée du gène Ras codant pour une protéine constitutionnellement active (H-Ras^{v12}) est responsable d'une augmentation du stress oxydant intracellulaire et de l'indice de prolifération [209]. La NAC est responsable d'une diminution de l'indice de prolifération des cellules transfectées par H-Ras^{v12}, montrant que le stress oxydant généré est nécessaire à l'effet mitogénique de Ras. L'inhibition de ce stress oxydant par le DPI suggère fortement une activation de la NADPH oxydase par Ras. Il a également été mis en évidence dans des cellules NRK que la transformation par H-Ras^{v12} induit une surexpression du gène de la NOX1 [235]. Dans ce modèle, l'inhibition de NOX1 supprime l'effet oncogénique de Ras.

2.4.1.2 L'augmentation de la production mitochondriale d'anion superoxyde

Surexpression de l'oncogène c-Myc et biogenèse mitochondriale

L'oncogène c-Myc est un facteur de transcription capable de réguler l'expression de 3 à 15% des gènes nucléaires, dont plusieurs impliqués dans la biogenèse des mitochondries et

la chaîne respiratoire [236, 237]. Il a été montré que la surexpression de c-Myc induit une production accrue de FRO par la chaîne respiratoire mitochondriale [238]. C-Myc induit au sein de la chaîne respiratoire un déséquilibre entre les complexes codés par l'ADN nucléaire dont il amplifie l'expression, et ceux codés par l'ADN mitochondrial dont l'expression reste inchangée. C'est cette dysfonction qui serait responsable de la production accrue de FRO [239]. Cette production accrue de FRO semble être responsable de l'instabilité génétique habituellement associée à la surexpression de c-Myc [236].

Interruption de la chaîne respiratoire par inactivation du gène d'une de ses sous-unités

Comme il a été détaillé dans la première partie, l'inhibition pharmacologique des complexes I ou III de la chaîne respiratoire ou la mutation inactivatrice d'une de ses sous-unités peuvent être responsables d'une production accrue d'anions superoxyde. Il existe de nombreux arguments pour penser que des mutations des gènes de la chaîne respiratoire peuvent participer à l'oncogénèse via la production de FRO. Une mutation germinale inactivatrice du gène nucléaire de la sous-unité C de la succinate dehydrogenase (SDHC) (complexe II de la chaîne respiratoire) est la cause d'une forme familiale de paragangliomes et de phéochromocytomes [240]. Il a été montré sur des fibroblastes NIH 3T3 transgéniques, que la mutation d'un des allèles du gène de SDHC est associée à une augmentation de la production mitochondriale d'anion superoxyde, à une instabilité génomique ainsi qu'à la possibilité de former des tumeurs chez la souris [241]. Des mutations sur les gènes des sous-unités de la chaîne respiratoire présentes sur l'ADN mitochondrial sont fréquemment retrouvées au cours du cancer [168]. Certaines de ces mutations pourraient être à l'origine d'un stress oxydant accru. Il a ainsi été retrouvé à partir de 20 cas de leucémie lymphoïde chronique une corrélation entre la présence de mutations sur l'ADN mitochondrial et une augmentation de la production d'anion superoxyde [242]. Le rôle des mutations de l'ADN mitochondrial a également été évalué plus spécifiquement en utilisant une lignée tumorale hybride trans-mitochondriale porteuse d'une mutation homoplasmique inactivatrice sur le gène de l'ATPase 6, sous-unité du complexe V [243, 244]. Comparativement à une lignée témoin porteuse d'un ADN mitochondrial non muté, il est noté une augmentation de la production d'anions superoxyde associée à une diminution de l'apoptose et à une tumorigénicité accrue chez la souris. Des mutations du gène de l'ATPase 6 sont mises en évidence dans des cancers du sein, du pancréas et du rein [168]. Ainsi, il semble exister un

cercle vicieux du stress oxydant reliant la transformation maligne et les mutations sur l'ADN mitochondrial comme cela a été suggéré par Trachootham et al. [1](figure 15).

Figure 15 : Le cercle vicieux du stress oxydant dans la cellule tumorale

Les FRO qui sont générées à partir de sources extracellulaires ou intracellulaires peuvent causer des dommages à l'ADN. Ces FRO peuvent activer la protéine p53 dans les cellules normales et déclencher une réponse au stress en déclenchant la réparation de l'ADN afin d'éliminer les dommages génétiques liés aux FRO. Dans les cellules cancéreuses avec une protéine p53 défectueuse, les lésions induites par la production de FRO à l'ADN seraient moins performantes. Dans les cellules cancéreuses avec une protéine p53 non défectueuse, les mutations de l'ADN induites par les FRO peuvent causer une perte de fonction de la protéine p53, ce qui entraîne un défaut de réparation de l'ADN conduisant à une accumulation de mutations géniques. Tous ces événements peuvent encore augmenter le niveau de FRO, conduisant à des dommages de l'ADN et à une instabilité génétique. Un tel cercle vicieux peut amplifier efficacement le stress oxydant et ainsi promouvoir l'instabilité génomique et le développement du cancer.

2.4.2 La diminution des capacités anti-oxydantes

Une insuffisance des systèmes anti-oxydants intracellulaires pourrait participer au stress oxydant observé dans les cellules tumorales :

- soit du fait d'une incapacité à compenser totalement une production accrue de FRO par la chaîne respiratoire ou la NOX.
- soit du fait d'un déficit primaire d'un de ces anti-oxydants.

Récemment, a été mis en évidence le rôle de la protéine p53 dans la régulation des défenses anti-oxydantes.

2.4.2.1 Les superoxyde dismutases

L'activité des SOD semble évoluer de façon variable dans les cellules malignes, comparativement aux tissus sains. L'activité SOD est diminuée dans les cellules tumorales hépatiques Hepa 1.6 comparées au foie normal de souris [245]. Le même résultat a été observé dans des adénocarcinomes colorectaux humains [246]. Une diminution de l'expression de la SOD2 est rapportée dans des lignées tumorales à une absence d'expression du gène par hyperméthylation [247] ou délétion du promoteur [248]. Cependant, la fréquence de ces anomalies dans les tumeurs primaires est inconnue.

A l'inverse, une augmentation des niveaux d'expression de la MnSOD et de la CuZnSOD est rapportée dans des cellules tumorales de différentes origines [249-252]. Une augmentation de l'expression des MnSOD et CuZnSOD est retrouvée dans respectivement 70% et 84% de tumeurs primaires de l'ovaire comparativement aux tissus sains des même patientes [253]. Dans une lignée de cancer de l'ovaire, l'augmentation de la production mitochondriale de FRO induite par la roténone est responsable d'une augmentation d'expression de la MnSOD [253]. Ce résultat suggère que l'augmentation de la SOD dans les tumeurs est un phénomène d'adaptation à la production accrue de FRO.

2.4.2.2 La catalase

Plusieurs études ont montré une diminution de l'expression de la catalase dans des tumeurs primaires humaines comparativement aux tissus sains : carcinome hépatocellulaire, cancer du poumon et lymphomes malins à grandes cellules [252, 254, 255]. Il a également été montré qu'une diminution d'expression de la catalase est associée à un moins bon pronostic des lymphomes agressifs à grandes cellules et des mésothéliomes [254, 256]. Il est possible qu'une diminution de la catalase participe à la transformation maligne en augmentant le stress oxydant.

2.4.2.3 Le système glutathion, GSH peroxydase (GPx) et GSH réductase (GR)

Plusieurs études ont montré une augmentation de la GPx et de la GR dans les cellules tumorales [257]. Dans des cancers du colon, il est noté une augmentation de l'activité de la

GPx comparativement aux tissus sains adjacents [258]. Il est probable que cette augmentation de la GPx est un phénomène adaptatif à l'accroissement de la production de FRO.

2.4.2.4 Le rôle de la protéine p53 dans la défense contre le stress oxydant

Plusieurs études ont montré que la protéine p53 est impliquée dans la prévention des dommages provoqués par le stress oxydant. Le stress oxydant induit une stabilisation et une activation de la protéine p53 [259]. Les mécanismes n'en sont pas parfaitement connus mais impliquent la reconnaissance par p53 de lésions spécifiques du stress oxydant sur l'ADN [260]. La protéine p53 permet de prévenir l'effet mutagène des FRO par deux types de mécanismes :

- en favorisant la réparation de l'ADN : p53 active le système d'excision de base qui permet la réparation des guanines hydroxylées [260]. Ainsi, dans des lignées déficientes pour le gène p53, il est noté une augmentation de la fréquence des 8-oxo-guanines et des mutations sur l'ADNmt après exposition à un stress oxydant. La protéine p53 est également impliquée dans le contrôle de l'intégrité du génome mitochondrial [261].

- en augmentant l'activité d'enzymes anti-oxydantes [262, 263]: Sablina et coll. ont récemment montré qu'une inhibition de la protéine p53 dans des lignées tumorales induit une augmentation du stress oxydant basal. Lors de l'exposition à un stress oxydant modéré (200µM de peroxyde d'hydrogène), l'activation de p53 est responsable d'une augmentation de l'expression des gènes de la Gpx1 et des peroxyredoxines 1 et 2. Chez des souris déficientes pour p53, l'administration continue de NAC réduit l'incidence des tumeurs et l'instabilité génomique. Ces résultats suggèrent que l'instabilité génomique constatée dans les tumeurs déficientes pour le gène p53 est liée à une augmentation des lésions provoquées par le stress oxydant du fait d'une diminution de l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN et des systèmes antioxydants.

2.5 Les variations du stress oxydant au cours de l'oncogénèse

La concentration intracellulaire de FRO n'est pas augmentée dans toutes les tumeurs.

Une diminution de la production de FRO peut en particulier être observée dans les cellules tumorales hypoxiques [228]. Ceci est logique puisque l'oxygène moléculaire est le substrat obligatoire pour la génération de l'anion superoxyde.

Une diminution de la production de FRO dans des tumeurs malignes peut également résulter d'une inhibition de la chaîne respiratoire qui peut avoir plusieurs causes :

- une augmentation du niveau d'expression de la protéine HIF-1 α , provoquée par l'hypoxie ou une perte de l'anti-oncogène VHL, entraîne un arrêt fonctionnel de la chaîne respiratoire mitochondriale et la génération d'ATP par glycolyse anaérobie (transformation du glucose en pyruvate puis en lactate) [264, 265].
- une absence d'expression des protéines de la chaîne respiratoire du fait de mutations de l'ADN mitochondrial au niveau de la zone d'initiation de la transcription et de la réplication, ou d'une absence d'expression de l'ADN polymérase gamma [168]. Les mutations de certains gènes mitochondriaux telles que ceux de la NADH déshydrogénase I peuvent également être associés à une diminution de la production de FRO [82].

Au total, les FRO jouent un rôle clair dans l'oncogenèse, à la fois par leurs effets mutagènes et par leur implication dans la signalisation intracellulaire. Ils influencent ainsi la prolifération et la survie des cellules tumorales mais également l'invasion et l'angiogénèse. Ce rôle des FRO a conduit à proposer depuis de nombreuses années l'utilisation d'anti-oxydants en prévention de la survenue du cancer. La plupart des essais cliniques ont cependant été très décevants [266]. Une des raisons est probablement que les FRO jouent en fait un rôle paradoxal dans le développement tumoral : à côté de leurs effets oncogéniques, ils peuvent également dans certaines conditions exercer un effet toxique sur les cellules tumorales. Cette notion et ses applications thérapeutiques potentielles sont développées dans la 3^e et dernière partie.

3. L'effet anti-tumoral du stress oxydant : Applications thérapeutiques

L'effet cytotoxique des FRO est bien connu puisqu'il a été établi depuis plusieurs années que les cellules phagocytaires utilisent les FRO à visée bactéricide [267]. Plus récemment, il a été mis en évidence qu'une production intracellulaire de FRO est impliquée dans l'induction de l'apoptose par un grand nombre de stimuli exogènes dans des cellules tumorales et non tumorales (tableau 5) [268]. Ce rôle des FRO a généralement été établi sur :

- la détection d'un stress oxydant dans les 2 à 6 heures qui suit l'exposition au stimulus et avant la survenue des premiers signes d'apoptose (activation des caspases, chute du potentiel transmembranaire mitochondrial).
- l'inhibition au moins partielle de l'apoptose par des anti-oxydants.

Les FRO possèdent un effet paradoxal sur les cellules malignes : nécessaires au développement tumoral, elles peuvent aussi ralentir la prolifération tumorale et/ou induire la mort cellulaire. Dans cette dernière partie, nous envisagerons les mécanismes possibles de cet effet paradoxal avant d'évaluer les applications thérapeutiques potentielles.

Tableau 5 : Liste non exhaustive d'inducteurs de l'apoptose pour lesquels un rôle du stress oxydant intracellulaire a été démontré [268-281]

Les inducteurs de l'apoptose pour lequel le stress oxydant est impliqué	
- Pro-oxydant	H ₂ O ₂ , le diamide et les semiquinones Irradiation aux UV ou gamma
- Radiations ionisantes	Cycloheximide
- Inhibiteur de synthèse des protéines	Interaction Fas / Fas ligand (CD95), TNF α , céramide, glutamate, IL2, IL3
- Stimulateurs d'apoptose	Glucocorticostéroïdes, calcium, TNF α , glutamate
- Stimulateur physiologique	Privation en sérum, déficit en IL2, déficit en IL3, hyperglycémie, mécanisme d'ischémie- reperfusion
- Conditions pathologiques	Protéine p53, Bax, c-myc
- Gènes pro-apoptotiques	Benzène, et ses métabolites, 2,5-hexanedione
- Solvants organiques et métaboliques	DDT, endosulfane, dieldrine, 2,3,7,8
- Pesticides	tetrachlorodibenzo-p-dioxin
- Drogues	Actinomycin D, cisplatine, cycloheximide, taxol, camptothecin, staurosporine, cisplatine, étoposide, alkylants, 5 fluoro-uracile, anthracyclines, vepeside, camptothécines, vinblastine, arsenic trioxide, bléomycine, bortezomib (inhibiteur du proteasome), rituximab (anticorps anti-CD20)

3.1 Les données expérimentales sur l'effet anti-tumoral des FRO

3.1.1 L'effets du peroxyde d'hydrogène

Dans plusieurs études, l'ajout de l' H_2O_2 dans le milieu de culture, à des concentrations généralement supérieures à 50 μM , provoque la mort cellulaire dans des lignées tumorales et non tumorales [280-284]. Le type de mort cellulaire semble dépendant de la concentration utilisée : entre 250 et 500 μM , la mort cellulaire induite par le peroxyde d'hydrogène sur une lignée lymphoïde non tumorale survient par un phénomène d'apoptose qui est prévenue par une surexpression de l'oncogène bcl-2. Au-delà de 1mM, survenait une nécrose cellulaire qui n'est pas empêchée par la surexpression de bcl-2 [282]. Pour mémoire, un effet pro-prolifératif de l' H_2O_2 sur des lignées tumorales a été observé à des concentrations généralement inférieures à 1 μM [204-206].

3.1.2 Les effets de la superoxyde dismutase

La SOD ajoutée au milieu de culture a généralement peu d'effet sur la viabilité cellulaire car sa pénétration intracellulaire est très faible. Plusieurs modèles de lignées tumorales transgéniques pour les SOD1 et 2 ont permis de mettre en évidence une augmentation de la concentration de peroxyde d'hydrogène qui s'accompagne *in vitro* d'une augmentation du temps de doublement et d'une diminution de la capacité à former des colonies [285-287]. Les cellules transgéniques sont bloquées en phase G1 du cycle cellulaire mais l'apoptose n'est pas augmentée [285]. Il est également constaté *in vivo* une diminution, voir une inhibition complète de la croissance tumorale chez la souris nude [285-287]. Cet effet des SOD est probablement lié à l'augmentation de la concentration intracellulaire de peroxyde d'hydrogène et non pas à une diminution de celle de l'anion superoxyde. En effet, la surexpression de la Gpx dans une lignée sur exprimant déjà la SOD2 restaure le phénotype tumoral de la lignée parentale [288].

3.1.3 Les effets des antioxydants

Dans certains modèles, des anti-oxydants peuvent accroître la croissance tumorale, suggérant que les FRO produits spontanément par les cellules tumorales puissent avoir un effet délétère. Ainsi, une lignée de thymome murin transfecté avec le gène de la catalase présente une diminution de l'apoptose spontanée et une augmentation de la croissance tumorale après implantation chez la souris, comparativement à la lignée parentale [289].

Chez des souris transgéniques pour le gène de la GSH peroxydase on constate une augmentation du nombre de tumeurs cutanées après exposition à un carcinogène [290].

3.2 Les mécanismes de l'effet cytotoxique des FRO

Un stress oxydant majeur peut induire une mort cellulaire par nécrose du fait d'une peroxydation des lipides membranaires et de lésions massives sur les protéines et l'ADN [282, 291]. Cependant, un tel stress oxydant est probablement rarement atteint *in vivo* en dehors de situations physiopathologiques bien particulières (ischémie - reperfusion, exposition à des radiations ionisantes ...). Les FRO peuvent participer au déclenchement de l'apoptose à plusieurs niveaux :

- en altérant la membrane mitochondriale
- en régulant l'activité de voies de transduction impliquées dans l'apoptose :
 - Activation de la voie des SAPK, de la céramide, de la protéine p53.
 - Inactivation de protéines anti-apoptotiques telle que NFκB.

3.2.1 Les FRO, la mitochondrie et l'apoptose

Il a été montré que le traitement de lymphocytes par la dexaméthasone entraîne un stress oxydant responsable d'une peroxydation lipidique, précédant de quelques heures la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et le déclenchement de l'apoptose [282, 292]. Ces résultats suggèrent que la peroxydation des lipides de la membrane mitochondriale par les FRO peut jouer un rôle important dans le déclenchement de l'apoptose.

L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène semblent capables d'augmenter la perméabilité des membranes mitochondriales, conduisant à la chute du potentiel trans-

membranaire et à la libération du cytochrome c dans le cytosol [82, 268, 292-294]. La présence de cytochrome c dans le cytosol entraîne l'activation en cascade des caspases et la mort cellulaire. Les FRO pourraient également induire la libération du cytochrome c en provoquant l'ouverture du « permeability transition pore », complexe protéique transmembranaire permettant les échanges ioniques [295-297]. Une fois enclenché, le processus apoptotique peut lui-même générer un stress oxydant quelqu'en ait été le stimulus initial. En effet, la libération du cytochrome c dans le cytoplasme conduit à un blocage du flux d'électrons au sein de la chaîne respiratoire et à une production accrue d'anion superoxyde au niveau du complexe I [9, 79].

Figure 16 : La membrane mitochondriale, cible des FRO [296]

La libération de facteurs de mort cellulaire par les mitochondries est accomplie par l'ouverture des pores dans les membranes mitochondriales. Deux voies intracellulaires contrôlent le programme d'apoptose cellulaire : la voie des récepteurs de mort cellulaire qui est déclenchée par la sécrétion de TNF, TRAIL et Fas, et la voie mitochondriale qui est activée par des stimuli intrinsèques (FRO par exemple). Le maintien de la morphologie d'étranglement de la membrane interne est nécessaire au bon déroulement de l'apoptose, en permettant la redistribution des crêtes et du cytochrome c (Cyt c) de l'espace intra-membranaire à l'espace inter-membranaire. Cette perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie est due à la fois à l'ouverture des pores préexistants (par exemple VDAC, PTP) et à la formation de pores ex novo (Bax / Bak) ou « permeability transition pore ».

3.2.1 La mise en jeu de voies pro-apoptotiques par les FRO

L'apoptose induite par la privation en IL3 d'une lignée lymphoïde non tumorale peut être diminuée par la NAC ou la surexpression de la Gpx suggérant un rôle des FRO dans la transmission du signal d'apoptose [282].

3.2.1.1 L'activation des Stress Activated Protein Kinases (SAPK)

Plusieurs études ont montré que les FRO, en particulier le peroxyde d'hydrogène, peuvent induire l'activation des kinases JNK [298-301]. Plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer l'activation des JNK par les FRO :

- le peroxyde d'hydrogène peut inactiver une phosphatase spécifique de JNK (JNK phosphatase M3/6) [302].
- une kinase JNK, ASK1, est inhibée par la fixation à la thioredoxine: les FRO peuvent activer ASK1 en oxydant le thioredoxine, ce qui provoque sa dissociation [303].
- de la même façon, les FRO peuvent provoquer la dissociation du complexe JNK- glutathion transférase – π et ainsi faciliter l'activation de JNK [304].

Comme décrit précédemment, les JNK ont été impliquées à la fois dans des signaux de survie cellulaire et d'apoptose [215, 217]. Cependant, dans des situations de stress (privation de facteur de croissance, exposition aux rayons UV, cytokines, cytotoxiques anti-tumoraux), l'activation des JNK est nécessaire à la transmission d'un signal pro-apoptotique [215]. L'activation des JNK est requise pour l'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque impliquant la caspase 9 et les mitochondries mais pas pour l'apoptose médiée par les récepteurs de mort (voie extrinsèque) [215]. Cet effet pro-apoptotique des JNK semble résulter de l'inhibition des molécules anti-apoptotique Bcl-2 et Bcl-Xl par phosphorylation [215, 301, 302, 305].

Il a été montré que les FRO sont impliquées dans l'activation des JNK en réponse à un stress. Ainsi, l'activation de JNK1 et l'apoptose induites par le cisplatine sont inhibées par la NAC mais potentialisées par l'ajout au milieu de peroxyde d'hydrogène [306]. Le rôle du stress oxydant dans l'activation de JNK a également été mis en évidence après traitement par un inhibiteur de topo-isomérase [307].

3.2.1.2 L'inhibition de NFκB

Il s'agit d'une famille de facteurs de transcription homo- ou hétéro-dimériques qui régulent l'expression de gènes impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires telles que la différenciation, la prolifération et la survie. Ils sont généralement considérés comme ayant un effet anti-apoptotique [308]. A l'état basal, les protéines NFκB sont séquestrées dans le cytoplasme par des protéines inhibitrices telles que IκBα. Après stimulation, IκBα est phosphorylé par des kinases de la famille IKK, entraînant son ubiquitination et sa dégradation. NFκB peut alors pénétrer dans le noyau, se fixer à l'ADN et induire la transcription de plusieurs gènes anti-apoptotiques tels que XIAP et Bcl-XL.

L'inhibition de NFκB présente à l'inverse un effet pro-apoptotique [216]. Plusieurs publications récentes suggèrent que le peroxyde d'hydrogène présente un effet inhibiteur sur l'activité de NFκB [216]. Cet effet serait dû à l'oxydation de résidus cystéines à la fois sur NFκB lui-même empêchant sa fixation sur l'ADN [309] et sur la kinase IKK provoquant son inactivation [310]. Il a également été montré que l'inhibition de NFκB s'accompagne d'une augmentation du stress oxydant [298]. La cause serait l'inhibition du CYP 1B1, producteur de FRO, par NFκB [299].

Figure 17 : L'induction de la mort cellulaire par le stress oxydant : le rôle de NFκB et de JNK [216]

L'inhibition de la protéine NFκB initie une boucle d'amplification des FRO. Cette inhibition conduit à une amélioration de la fonction du récepteur des hydrocarbures aryles et une expression accrue des membres de la famille p450. La surexpression de p450 entraîne une production de FRO (ROS). Les FRO inhibent NFκB via une oxydation de la protéine IKKs ou p50. L'accumulation de FRO soutenue par l'activation de la c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) conduit soit à la mort cellulaire (flèche pleine) soit à la survie cellulaire (flèche en pointillée).

L'inhibition de NFκB ou un stress oxydant peuvent ainsi initier une boucle d'amplification aboutissant à la mort cellulaire (figure 17) [216]. Cette boucle implique les kinases JNK dont l'effet pro-apoptotique semble nécessiter l'inactivation simultanée de NFκB [308, 309].

3.2.1.3 L'activation de la voie « sphingomyelinase – ceramide »

La sphingomyeline est un composé phospholipidique présent dans la membrane plasmique. Son hydrolyse par la sphingomyelinase provoque la génération de phosphocholine et de céramide [321, 322]. La céramide est considérée comme un médiateur de mort cellulaire, et en particulier d'apoptose, via l'action sur de nombreuses cibles décrites dans la figure 18.

Figure 18 : La voie de la céramide et les possibles cibles [311]

AP-1 : activating protein-1 ; CAPK : ceramide-activated protein kinase; CAPP : ceramide-activated protein phosphatase; MAPK : mitogen-activated protein kinase; PLA2 : phospholipase A2; PKC : protein kinase C; PLD : phospholipase D; SAPK : stress-activated protein kinase.

Le stress oxydant peut provoquer l'activation de la sphingomyelinase. Il a été montré que l'activation de la sphingomyelinase par différents stimuli, dont la fixation du TNF α sur son récepteur ou les anthracyclines, nécessite la génération d'un stress oxydant [323, 324]. L'activité de la sphingomyelinase acide semble être modulée directement par les FRO via un résidu cystéine à son extrémité N-terminale: le peroxyde d'hydrogène provoque la formation d'un pont disulfide et la dimérisation de la protéine dont l'activité est alors augmentée [325]. En retour, la céramide peut elle-même induire un stress oxydant en particulier par l'activation de la NADPH oxydase. Elle entraîne en effet l'activation de la protéine kinase C, elle même responsable de l'activation de la sous-unité régulatrice p47^{phox} de la NADPH oxydase [312].

3.2.1.4 L'activation de p53

Les conséquences de l'activation de p53 par le stress oxydant semblent dépendantes de l'intensité de ce dernier [273]. Comme décrit précédemment, un stress oxydant « modéré » induirait plutôt une réponse de type « anti-oxydante », marquée par une augmentation de l'expression de la Gpx1 et permettant de protéger la cellule contre l'effet mutagène des FRO. Il a cependant été rapporté que pour une concentration de 1mM de peroxyde d'hydrogène, cet effet antioxydant disparaît et que l'activation de p53 induit l'expression de protéines augmentant plutôt le stress oxydant et conduisant à la mort cellulaire [273, 326]. L'activation

de p53 par un stress oxydant intense peut ainsi conduire à accroître encore la production de FRO, établissant une boucle d'amplification conduisant finalement à la mort cellulaire [313]. Ce deuxième type de réponse permettrait l'induction de la mort cellulaire face à un stress oxydant pouvant induire des dommages non réparables à l'ADN (figure 19) [313].

Figure 19 : « Sauveur et exterminateur : les deux faces de p53 » [313]

La protéine p53 a une fonction pro-oxydante et une fonction anti-oxydante. (a) En l'absence de stress ou après un stress modéré, un faible niveau de protéine p53 dirige l'expression de gènes antioxydants permettant de diminuer le niveau de FRO et protège ainsi les cellules des dommages à l'ADN. (b) Un niveau de stress oxydant élevé ou prolongé renforce l'activation de la protéine p53 et conduit à l'induction de gènes pro-oxydants et augmente le niveau de FRO entraînant la mort cellulaire. Ce mécanisme contribue à la suppression des cellules tumorales. (c) La perte de fonction de la protéine p53 dans les cellules normales augmente les niveaux intracellulaires de FRO, et endommage l'ADN ce qui augmente le taux de mutation. L'incapacité à activer l'apoptose induite par la protéine p53 en réponse à ces altérations oncogéniques aboutit finalement à l'apparition du cancer.

3.3 Les mécanismes de l'effet cellulaire paradoxal des FRO

3.3.1 L'effet dose

L'explication la plus souvent évoquée pour expliquer l'effet paradoxal des FRO serait que leur effet biologique, et en particulier celui du peroxyde d'hydrogène, soit dépendant de sa concentration. Lambeth et al. ont émis l'hypothèse qu'à faible concentration seules des protéines hypersensibles telles que les tyrosine – phosphatases sont oxydées ce conduisant à la transmission d'un message de prolifération et de survie [43]. A des concentrations plus élevées, l'oxydation de protéines moins réactives s'ajoutant à des altérations sur l'ADN et les lipides pourrait conduire à la mort cellulaire [43]. Ainsi, les concentrations de peroxyde d'hydrogène qui permettent d'obtenir une accélération de la croissance tumorale sont généralement inférieures à 1 μM , tandis qu'un effet toxique est observé pour des concentrations supérieures à 200 μM . Cependant, très peu d'études ont directement mis en évidence un effet paradoxal des FRO en fonction de leur concentration. Un tel effet a été montré sur des lymphocytes normaux exposés à des concentrations croissantes de Paraquat qui induit la production d'anions superoxyde : de faibles concentrations induisent une augmentation de la prolifération, tandis que des concentrations supérieures à 30 μM induisent une apoptose et une nécrose au delà de 100 μM [328]. La durée d'exposition au stress oxydant semble également être un paramètre important : un stress oxydant prolongé est susceptible d'entraîner une activation plus intense et durable des JNK qui induirait l'apoptose alors qu'une activation transitoire et faible induirait plutôt la prolifération [329].

3.3.2 Le type de FRO

L'effet anti-tumoral d'une surexpression de la SOD suggère que le peroxyde d'hydrogène est plus toxique pour les cellules tumorales que l'anion superoxyde. Ceci peut s'expliquer par leurs propriétés physico-chimiques respectives. En effet, l'anion superoxyde est beaucoup moins réactif que le peroxyde d'hydrogène, en particulier vis à vis des protéines. De plus l'anion superoxyde ne peut traverser les membranes biologiques du fait de sa charge négative alors que le peroxyde d'hydrogène peut diffuser à distance du fait de son caractère lipophile. Il est donc probable que l'anion superoxyde produit par la chaîne respiratoire est peu toxique en lui-même mais nécessite d'être transformé en peroxyde d'hydrogène par la SOD 2 pour induire un effet cellulaire toxique. Il a cependant été observé que l'inhibition de la SOD par le 2-methoxy-oestradiol pouvait induire la mort cellulaire. Il semble que dans ce cas l'accumulation massive dans les mitochondries d'anions superoxyde induit directement une altération de la membrane mitochondriale et l'apoptose [330].

La toxicité des FRO peut également être augmentée par la présence de cations métalliques tels que le Fe^{2+} qui catalysent la formation de radical hydroxyl, très réactif, à partir du peroxyde d'hydrogène [163].

3.3.3 Le contexte génétique

La réponse cellulaire au stress oxydant dépend du caractère fonctionnel de protéines impliquées dans cette réponse, en particulier :

- la protéine p53 : dans une lignée de cancer du colon, la réduction de croissance tumorale induite par une surexpression de la MnSOD est dépendante de p53, et la MnSOD est sans effet sur la croissance tumorale dans la lignée p53/- [313].
- la protéine NFκB : une activation dérégulée de NFκB peut inhiber l'effet pro-apoptotique des JNK activées par le stress oxydant [298].

3.4 La sensibilité des cellules tumorales au stress oxydant et l'équilibre d'oxydo-réduction (Redox)

Comme les cellules cancéreuses ont une augmentation de la production de FRO et reçoivent un stress oxydant intrinsèque supérieur à la cellule normale, il est concevable que ces cellules malignes soient plus dépendantes des antioxydants pour leur survie et, par conséquent, plus vulnérables à de nouvelles agressions oxydantes induites par des produits générateurs de FRO ou par des composés qui inhibent les systèmes antioxydants essentiels [314]. Cette différence de sensibilité pourrait être liée à une concentration basale de FRO plus élevée dans les cellules tumorales que dans les cellules saines. En conséquence dans les cellules tumorales, un stress oxydant supplémentaire conduit plus vite à une concentration létale de FRO [316, 331].

L'idée d'induire la mort des cellules tumorales par un mécanisme lié aux FRO induites en fonction des différents états d'oxydo-réduction intra cellulaire dans les cellules normales et malignes (figure 20) est proposée depuis plus d'une décennie [1, 191, 332, 333]. Les FRO pourraient agir comme une épée à double tranchant. Une augmentation modérée de FRO peut favoriser la prolifération et la survie cellulaire. Toutefois, lorsque l'augmentation de FRO

atteint un certain niveau (seuil de toxicité), il peut dépasser la capacité anti-oxydante de la cellule et induire une mort cellulaire. Dans les conditions physiologiques, les cellules normales sont capables de maintenir un niveau d'oxydo-réduction homéostatique avec un niveau basal bas de FRO en contrôlant l'équilibre entre la production et l'élimination des FRO. Les cellules normales peuvent tolérer un certain niveau de contrainte exogène en raison de leur capacité de 'réserve' anti-oxydante. Dans les cellules cancéreuses, l'augmentation de la production de FRO à partir des anomalies métaboliques et de signalisation oncogénique peut déclencher une réaction redox d'adaptation conduisant à une régulation et ainsi à une augmentation de la capacité anti-oxydante de la cellule. Dans ce cas, un changement de la dynamique d'oxydo-réduction avec une production élevée de FRO est observé. De même, une élimination plus élevée de FRO doit être réalisée par la cellule afin de maintenir les niveaux de FRO en dessous du seuil de toxicité. En tant que telles, les cellules cancéreuses seraient plus dépendantes du système antioxydant et plus vulnérables au stress oxydant induit. Une nouvelle augmentation des FRO dans les cellules cancéreuses à l'aide d'agents modulant le stress oxydant serait susceptible de provoquer une élévation de FRO au-dessus du niveau du seuil vital, ce qui conduirait à la mort cellulaire. Plusieurs cas d'agents inducteurs de FRO ont été rapportés dans la littérature comme des molécules présentant une activité anti-tumorale *in vivo*. En revanche il existe une réponse clinique peu manifeste [334-337]. Il a été proposé que cela soit l'élévation de certains facteurs de transcription des antioxydants et des signaux de survie qui permette à la cellule de s'adapter à ce stress induit et permette ainsi d'expliquer la capacité de résistance de la cellule [336, 338].

Figure 20 : Le niveau de FRO dans la cellule normale et dans la cellule tumorale [1]

Les cellules normales peuvent tolérer un certain niveau de contrainte exogène en raison de leur capacité de 'réserve' anti-oxydante. Ces réserves peuvent être mobilisées pour éviter que le niveau de FRO atteigne le seuil de la mort cellulaire (ligne horizontale en pointillés sur la figure). Les cellules tumorales présentent un niveau de FRO à l'état basal plus élevé que la cellule normale et un système d'élimination des FRO plus actif. Une augmentation des FRO dans les cellules cancéreuses (barre rouge) à l'aide d'agents modulant le stress oxydant est susceptible de provoquer une élévation de FRO au-dessus du niveau de seuil, et de conduire la cellule tumorale à la mort cellulaire.

3.4.1 Promouvoir la production de FRO

La fuite d'électrons à partir des complexes respiratoires dans les mitochondries est une source majeure de production de FRO comme nous l'avons vu précédemment [315]. Des agents comme le trioxyde d'arsenic, qui portent atteinte à la fonction de la chaîne respiratoire sont connus pour augmenter la production d'anion superoxyde [93]. Alternativement, des intermédiaires radicalaires sont également formés par les composés connus sous le nom « redox Cycler », qui peuvent réagir avec des réductases flavoprotéines comme le cytochrome P450 réductase et la NADPH formant l'oxydoréductase quinone (NQO1). Ces dérivés génèrent l'anion superoxyde en présence d'oxygène [340, 341].

Un autre mécanisme de production de FRO a été décrit avec la doxorubicine. La doxorubicine induit la production de FRO et la chélation du fer intracellulaire, ce qui peut déclencher une réaction de Fenton conduisant à la génération de radical hydroxyl [342]. D'autres chélateurs du fer ont été développés pour modifier la production de FRO et sont par exemple le Dp44mT et OCX-191 ou 3-AP [343-345]. L'activité des enzymes génératrices de FRO dans le complexe NOX semble être augmentée dans des lignées cellulaires de cancer et dans les tissus primaires [346, 347]. L'utilisation d'agents pharmacologiques promouvant NOX et régulant ainsi la production de FRO dans les cellules cancéreuses représente une voie de recherche à explorer. A ce titre le rétinoïde synthétique N-(4-hydroxyphényl) rétinamide (4HPR) semble exercer son effet cytotoxique contre les cellules cancéreuses, au moins en partie, par élévation de la sous-unité de p67phox NOX [348].

3.4.2 L'interaction avec le métabolisme des FRO

Le système du glutathion représente le principal système d'évacuation des FRO dans les cellules. La modulation du système enzymatique redox est importante, y compris les peroxydases, peroxyrédoxines et thiol-réductases, s'appuyant sur le GSH dans la cellule comme source d'équivalents réducteurs. Par conséquent, les stratégies pour induire une perte de GSH réduit peuvent avoir un effet profond sur la survie cellulaire et la sensibilité aux médicaments en modifiant la capacité des cellules à détoxifier les FRO et ainsi faire face aux dommages oxydatifs. Grâce aux interactions d'électrons-nucléophile, les composés comme les isothiocyanates et les dérivés d'aziridine sont rapidement conjugués par la GSH, ce qui provoque un appauvrissement de la GSH disponible et augmente ainsi le stress oxydant cellulaire provoquant la mort cellulaire [316-318]. L'appauvrissement en GSH peut également être obtenu en ciblant sa synthèse. Le Buthionine sulfoximine (BSO) est un inhibiteur de la γ -glutamyl-cystéine synthétase (γ -GCS), permettant la diminution de production de GSH [319]. Ce composé a été mis en évidence comme agent capable de causer une diminution du glutathion et d'augmenter l'efficacité des molécules de chimiothérapie dans différents types de cellules cancéreuses. En outre, les inhibiteurs de la xC- Cystine / glutamate antiport, tels que sulfasalazine, peuvent également provoquer la déplétion en GSH en inhibant l'absorption de la cystine, le précurseur de la cystéine, qui est un substrat limitant la synthèse de GSH [320]. Un autre antioxydant à base de thiol est la thiorédoxine, qui semble être régulée positivement dans les cellules cancéreuses et est corrélée avec l'agressivité du cancer et de la résistance aux chimiothérapie [321, 322]. Récemment le développement d'inhibiteurs spécifiques ciblant la thiorédoxine 1 (Trx-1) et la thiorédoxine réductase 1 (TR1) a été proposé [323]. Par exemple PX-12 (1-méthylpropyl 2-imidazolyl disulfure) a été conçu comme un Trx-1 inhibiteur, avec une activité anti-tumorale puissante *in vivo* [324]. Des inhibiteurs spécifiques des enzymes anti-oxydantes telles que d'autres SOD, catalase et l'hème oxygénase-1 (HMOX1) ont également été identifiés et sont actuellement à divers stades du développement des médicaments. Une attention particulière sera donnée un prochain chapitre sur un mimétique de la SOD : le mangafodipir.

3.4.3 Surmonter les mécanismes de résistance liée à une adaptation du système Redox

L'exploitation de la vulnérabilité des cellules cancéreuses au stress oxydant intrinsèque par une agression exogène via des agents générateurs de FRO permettant d'obtenir

une mort cellulaire a été validée *in vitro*. Si les agents modulateurs des FRO montrent des résultats prometteurs, il semble cependant que certaines cellules cancéreuses acquièrent une capacité à résister à un stress oxydant intrinsèque en augmentant leur capacité anti-oxydante. Cette adaptation d'oxydo-réduction permet uniquement aux cellules cancéreuses de survivre au sein d'un niveau élevé de stress oxydant et permet d'expliquer une part du mécanisme de chimiorésistance. A titre d'exemple, la résistance à l'arsenic trioxyde a été retrouvée comme associée à une régulation augmentée de HMOX1, SOD1 et GSH101 [325]. De même, plusieurs études suggèrent que la résistance à des agents induisant la production de FRO intracellulaires, tels que le paclitaxel, la doxorubicine ou des sels de platines, est corrélée avec l'augmentation de leur capacité anti-oxydante [326, 327].

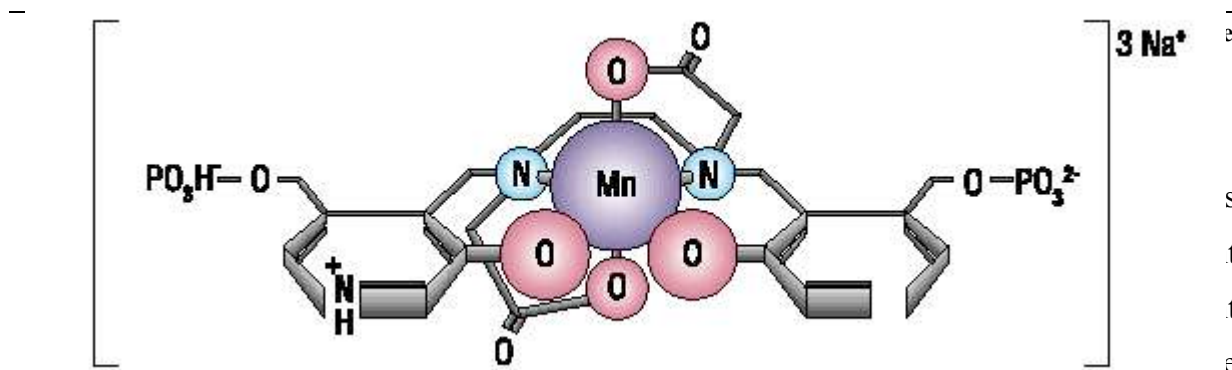
Afin d'obtenir une efficacité thérapeutique ou d'optimiser le traitement anticancéreux, il paraît intéressant de concevoir une stratégie via de nouvelles molécules, qui utilise la différence d'oxydo-réduction entre les cellules normales et les cellules cancéreuses, et qui désactive le mécanisme d'adaptation d'oxydo-réduction dans les cellules cancéreuses. Une telle approche consiste à cibler les mécanismes principaux d'oxydo-réduction afin de réguler à la fois le niveau des FRO et la fonction des protéines de survie cellulaire sensibles à l'oxydo-réduction. Dans cette optique le composé -thiol de la GSH, la thiorédoxine et peroxiredoxine peuvent être considérés comme des cibles potentielles pour une telle intervention sur les réactions d'oxydo-réduction.

3.4.4 La stratégie thérapeutique basée sur la modulation du stress oxydant

La prise de conscience que de nombreux médicaments de chimiothérapie actuellement utilisés ont des actions sur les voies d'oxydoréduction et peuvent contribuer à leur activité anti-tumorale a conduit à explorer les molécules ciblant spécifiquement l'équilibre redox intracellulaire. Il existe actuellement plusieurs agents cytotoxiques en développement qui ont un impact sur la régulation redox cellulaire (tableau 6) [9,31-44].

Tableau 6 : Liste non exhaustive d'agents modulateurs du stress oxydant actuellement en développement [328]

Classe thérapeutique	Molécule	Mécanisme de modulation de l'oxydoréduction
G l u t a t h i o n NO V- 002 [329, 330]		



la réparation de l'ADN. Parmi les agents de développement qui modulent l'état d'oxydoréduction ou la médiation de leurs effets via la S-glutathionylation, NOV-002 a été le plus étudié [340]. NOV-002 est un produit breveté contenant du glutathion oxydé qui modifie le glutathion réduit. NOV-002-S induite par la glutathionylation a été démontré comme ayant un effet inhibiteur de l'invasion des cellules tumorales [348], de la prolifération et la survie [349]. Des résultats positifs ont été obtenus à partir d'un essai de phase II chez des patients avec une thérapie néo adjuvante du cancer du sein et le cancer ovarien résistant à la chimiothérapie. Une récente étude randomisée, en ouvert, lors d'un essai de phase III a évalué NOV-002 en association au carboplatine et au paclitaxel (PC) versus une monothérapie chez les patients présentant un cancer bronchique non à petites cellules avancé (NSCLC stade IIIB-IV). La survie globale médiane (OS) pour le groupe traité par PC + NOV-002 est de 10,2, identique au groupe traité par PC qui est de 10,8 mois ($p = 0,375$). Les médianes de survie sans progression ne sont pas non plus différentes dans les deux groupes (5,3 mois pour le groupe PC + NOV-002 *versus* 5,6 mois pour le groupe PC).

L-Buthionine-S, R-sulfoximine (buthionine sulfoximine) a longtemps été connu pour induire un stress oxydant cellulaire via un épuisement du glutathion intracellulaire, [331, 350, 351] et il a également été identifié comme agissant de manière synergique avec la chimiothérapie cytotoxique, notamment le trioxyde d'arsenic, le cisplatine, la doxorubicine et le melphalan [336].

L'arsenic trioxyde (As_2O_3)

L' As_2O_3 est connu comme un puissant inducteur de stress oxydant dans les cellules tumorales [1, 352]. Il a aussi été rapporté que l' As_2O_3 augmentait la concentration intracellulaire de NO [353] mais cette observation pourrait dépendre de la dose d' As_2O_3 utilisée et du type cellulaire testé [354]. Il a été montré que l'apoptose induite par l' As_2O_3 est dépendante de l'accumulation intracellulaire de peroxyde d'hydrogène [273]. Cette génération de FRO aurait deux sources principales : la chaîne respiratoire mitochondriale [82] et

DEMARCHE EXPERIMENTALE

L'objectif de ce travail était d'explorer l'intérêt d'une modulation pharmacologique du stress oxydant intracellulaire en oncologie. Depuis quelques années, le rôle central du stress oxydant dans la cellule tumorale et son impact potentiel en oncologie sont largement reconnus. Les travaux de Alexandre et al., réalisés dans l'EA1833, ont montré que des modulateurs du stress oxydant présentent d'un côté une activité anti-tumorale propre, et parfois synergique avec la chimiothérapie, et de l'autre un effet protecteur des cellules normales avec une diminution de la neutropénie chimio induite [345].

Comme une partie de l'activité anti-tumorale de la chimiothérapie est induite par le stress oxydant, nous nous sommes dans **un premier temps intéressés aux variations du stress oxydant lors d'un traitement par un inhibiteur de tyrosine kinases**. Ce premier axe de recherche repose sur les hypothèses et les données suivantes:

- les tumeurs solides, principalement le carcinome hépatocellulaire (CHC), sont connues pour présenter une néo-angiogénèse importante et un niveau de stress oxydant élevé [390-393].
- les inhibiteurs de tyrosine kinases sont actuellement largement prescrits car ils sont notamment validés dans les tumeurs neuroendocrines [394], les tumeurs rénales [395, 396] et le CHC [397].
- le CHC se développe préférentiellement chez les patients cirrhotiques. La cirrhose correspond à l'évolution ultime de la plupart des maladies chroniques du foie. Sa traduction clinique est variable, car la plupart des signes témoignent soit de ses complications (insuffisance hépatocellulaire, hypertension portale) soit de son étiologie. Les patients suivis pour un CHC présentent donc une comorbidité augmentant le risque de mauvaise tolérance du traitement. Un inhibiteur de tyrosine kinases, le sorafenib (BAY-43-9006 Nexavar ®, Bayer Pharmaceuticals Corp, Wayne NJ et Onyx Pharmaceuticals Inc, Emeryville CA), est actuellement le seul traitement médical avec une autorisation de prescription en France dans le CHC avancé non opérable [397].
- le sorafenib peut avoir une activité anti-tumorale liée à l'induction d'un stress oxydant [398].

Nous avons tout d'abord étudié au sein de cette population fragile, la relation entre l'efficacité d'un traitement par le sorafenib et l'induction du stress oxydant afin de déterminer d'éventuels marqueurs prédictifs d'efficacité (article 1).

L'efficacité anti-tumorale des chimiothérapies conventionnelles ou des inhibiteurs de tyrosine kinases passe au moins en partie par l'induction de FRO [1, 345, 398]. De plus, des modulateurs du stress oxydant, comme le mangafodipir (Teslascan®; Nycomed. Amersham Imaging, Little Chalfont, UK), sont capables *in vivo* d'augmenter l'index thérapeutique des cytotoxiques anti-tumoraux, par une modulation différentielle du stress oxydant dans les cellules tumorales et non tumorales [345]. Le stress oxydant auquel est soumis la cellule tumorale est en effet très différent de celui des cellules normales, de part son intensité, ses mécanismes de production et sa régulation. Les cellules normales seraient ainsi « protégées » lors du burst oxydatif induit par les sels de platine mais pas les cellules tumorales. Ainsi, les mimétiques de la SOD pourraient permettre de diminuer voire d'empêcher la neurotoxicité des sels de platine.

Le mangafodipir a été identifié dans le laboratoire comme modulateur du stress oxydant ayant à la fois des propriétés superoxyde dismutase (SOD), catalase et GSH-reductase. Cette molécule diminue les effets toxiques d'un stress oxydant mesuré dans des cellules non tumorales. Alexandre et al ont observé que le mangafodipir présente une capacité à minimiser la toxicité hématologique de plusieurs cytotoxiques anti-tumoraux et potentialise leur activité anti-tumorale à la fois *in vivo* et *in vitro* [345]. **Ces données nous ont conduits à explorer *in vitro* et *in vivo* les effets de l'association du mangafodipir à un sel de platine, l'oxaliplatine. Nous avons également étudié le mécanisme de la neurotoxicité induite par cette chimiothérapie et le rôle protecteur du mangafodipir** (article 2).

La majorité des cytotoxiques anti-tumoraux présentent un mécanisme d'action induisant un stress oxydant qui participe à leur effet cytotoxique de façon directe ou indirecte. Ceci a en particulier été montré pour les agents alkylants, les inhibiteurs de topo-isomérases, les taxanes, les sels de platine et le 5-fluorouracile. De part leur effet différentiel sur la cellule normale et la cellule tumorale, les modulateurs du stress oxydant représentent un axe de développement de nouvelles molécules en oncologie.

Des travaux du laboratoire ont montré que les cellules tumorales étaient plus sensibles aux effets toxiques des mimétiques de la SOD que les tissus sains du fait du stress oxydant basal intense auquel elles sont soumises [182]. Plusieurs stratégies ont été proposées pour utiliser la présence de formes réactives de l'oxygène (FRO) dans les cellules tumorales afin de cibler sélectivement les tumeurs sans endommager les tissus sains. Des agents tels que des quinones et l'oxyde d'arsenic (As_2O_3), augmentent les niveaux de FRO dans les cellules.

Nous avons émis l'hypothèse que les catalyseurs du système d'oxydo-réduction peuvent présenter un effet anti-tumoral propre et pourraient augmenter la production de FRO potentialisant l'activité de cytotoxiques anti-tumoraux. Si cette hypothèse était vérifiée, des composés capables d'augmenter la production de FRO ou de diminuer leur élimination intracellulaire seraient efficaces.

Le troisième axe de travail avait pour objectif d'identifier et de valider des nouvelles classes médicamenteuses en oncologie liées à la modulation des FRO. Cette partie de l'étude a été réalisée dans le cadre d'un projet européen Pierre et Marie Curie, au sein du réseau Red Cat. (Red Cat International Training Network 7-FP7-2007-1-1-ITN201114). Le réseau Red Cat comprend 10 laboratoires universitaires, d'instituts de recherche et d'industriels originaires de cinq pays européens. Ce réseau a pour but de développer et d'étudier de nouvelles molécules anti-oxydantes utilisables en clinique humaine et animale. Cette collaboration a permis la conception et la synthèse de nouveaux agents, les organo-chalcogènes. Une évaluation de leur efficacité anti-tumorale sur un large éventail de tumeur a été effectuée. **Nous avons cherché à savoir si cette stratégie thérapeutique pouvait être associée à la chimiothérapie conventionnelle principalement avec les inhibiteurs de topoisomérases et les sels de platines largement utilisés en clinique** (article 3 et 4).

Article 1. L'efficacité anti-tumorale des inhibiteurs de tyrosine kinase dans les carcinomes hépatocellulaires avancés passe par l'induction d'un stress oxydant

Les traitements cytotoxiques conventionnels induisent un stress oxydant. Dans ce travail, nous avons souhaité vérifier l'hypothèse qu'un stress oxydant est nécessaire lors de l'introduction d'un traitement par inhibiteurs de tyrosine kinases dans une population fragile de patients cirrhotiques traités pour un CHC avancé.

Le CHC est l'un des cancers dont l'incidence est la plus élevée avec 626 000 nouveaux cas par an dans le monde [399]. L'incidence du CHC est en augmentation aux États-Unis et en Europe et il représente actuellement la troisième cause de décès par cancer au niveau mondial [399]. La pathologie est généralement diagnostiquée à un stade avancé. Le pronostic des patients avec un CHC non opérable est sombre en raison de la maladie hépatique sous-jacente et du manque d'options thérapeutiques efficaces [400, 401]. Le sorafenib (Nexavar®), est un inhibiteur de kinases qui diminue la croissance tumorale et inhibe l'angiogenèse dans le CHC avancé [402, 403]. Cette molécule exerce un effet direct sur la prolifération des cellules tumorales et agit aussi sur les cellules endothéliales pour inhiber l'angiogenèse tumorale [404, 405]. Le sorafenib est le seul traitement non chirurgical et non radiologique qui améliore la survie globale des patients présentant un CHC avancé [397].

Le CHC présente à la fois une expression élevée et une activité accrue de la MAP kinase (MAPK) adjacente en comparaison aux hépatocytes normaux [406]. Le sorafenib inhibe la prolifération des cellules tumorales et induit la mort cellulaire par l'inhibition des voies Raf / MEK / ERK [404]. Le traitement des cellules CHC avec un inhibiteur de MEK réduit la prolifération cellulaire et l'apoptose [407]. Plusieurs études ont montré un lien entre le potentiel oncogène de ERK à l'activation des protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, PAI et la répression des protéines pro-apoptotiques, telles que Bad et Bim [408]. Il a également été montré que la sur-activation de la voie MEK / ERK dans les cellules tumorales du foie confère une résistance à la mort cellulaire induite par le TGF- β via une

mauvaise régulation de la NOX4 et entraîne une augmentation du niveau de FRO [390, 409]. Il a été établi qu'une augmentation modérée de FRO peut favoriser la prolifération et la différenciation cellulaire [410, 411], tandis que des quantités excessives de FRO peuvent endommager les lipides, les protéines et l'ADN, conduisant à la mort cellulaire [184, 412].

Le sorafenib inhibe la voie MEK / ERK [404] et intervient donc dans la production de FRO au cours du CHC. Nous avons cherché à savoir si le sorafenib pouvait exercer ses effets cytotoxiques via une restauration de la sensibilité des cellules de CHC à une augmentation des FRO. Pour cela nous avons étudié les taux des principales FRO dans les cellules de CHC humaines (HepG2) et murines (Hepa 1.6) lors d'une exposition au sorafenib. Nous avons ensuite étudié les conséquences de l'inhibition sélective de différentes FRO *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de CHC. Enfin, nous avons montré *ex vivo* que l'élévation de produits avancés de protéines oxydées (AOPP) dans le sérum des patients après 15 jours de traitement par sorafenib est corrélée avec son efficacité anti-tumorale.

Principaux résultats

In vitro, dans des lignées de cellules murines ou humaines de CHC, le sorafenib entraîne une production dose-dépendante de FRO. Le sorafenib augmente la production d'O₂^{•-}, de NO et de H₂O₂ dans les cellules humaines et murines de CHC (HepG2 et Hepa 1.6). A une concentration élevée de sorafenib (10 mg/l), le taux d'O₂^{•-} est augmenté de 33% avec les cellules HepG2 (P <0,05) et de 300% avec les cellules Hepa 1.6 (P <0,001). L'association d'un mimétique de la SOD, le MnTBAP, au sorafenib inhibe la production d'O₂^{•-} dans les deux lignées cellulaires testées. De même, l'ajout de diphenyleneiodonium (DPI), inhibiteur de NADPH oxydase, au sorafenib inhibe la production d'O₂^{•-}.

L'anion superoxyde peut provenir du complexe mitochondrial I ou III de la chaîne respiratoire mitochondriale, de la NADPH oxydase ou de la xanthine oxydase. Afin de discriminer ces différentes voies nous avons utilisé de la roténone et de l'antimycine, respectivement inhibiteurs des ces complexes I et III. Nous avons observé une augmentation de la production d'O₂^{•-} des cellules tumorales HepG2 et d'Hepa 1.6 et des cellules normales endothéliales sans modification de la production d'anion superoxyde induite par le sorafenib. L'allopurinol, inhibiteur de la xanthine oxydase, diminue la production basale de l'O₂^{•-} dans les trois lignées cellulaires sans modifier la production de l'anion superoxyde induite par le sorafenib. L'acide diethyldithiocarbamic (DDC), un inhibiteur de la SOD, améliore la production de l'O₂^{•-} dans toutes les lignées cellulaires testées sans modifier la production d'anion superoxyde induite par le sorafenib. L'association de 5mg/l de sorafenib à la N-acetyl cysteine (NAC), qui possède une activité catalase et glutathione-reductase, inhibe la production de l'H₂O₂ dans toutes les lignées cellulaires testées (P <0,05 pour HepG2, P <0,001 pour Hepa 1,6 et P <0,001 pour les HUVEC). L'utilisation de MnTBAP associé au sorafenib augmente la production de l'H₂O₂ dans les lignées cellulaires. L'ajout du MnTBAP au sorafenib réduit la production de l'O₂^{•-} dans les cellules car ce mimétique de MnSOD dismute l'O₂^{•-}. De plus, le sorafenib augmente la production de l'O₂^{•-} et de l'H₂O₂ dans les cellules les premières heures de mise en contact.

In vitro, le sorafenib exerce un effet dose dépendant cytostatique et cytotoxique dans les cellules tumorales de CHC (HepG2 et Hepa 1,6). A 5 mg/l, le sorafenib diminue leur index

de prolifération de 98% pour les cellules HepG2 ($P < 0,001$), de 90% pour les cellules d'Hepa 1.6 ($P < 0,001$) et de 26% pour les cellules non tumorales HUVEC ($P < 0,05$).

Afin de déterminer les voies métaboliques par lesquelles le sorafenib exerce ses effets cytostatiques et cytotoxiques, la molécule a été associée au MnTBAP, à la NAC, ou au L-NAME. Le MnTBAP inhibe significativement les effets cytostatiques et cytotoxiques du sorafenib, contrairement à la NAC et au L-NAME. Dans les cellules exposées au sorafenib pendant 48 heures, la réserve en GSH est diminuée. La NAC inverse partiellement la déplétion de GSH, et le MnTBAP aggrave l'appauvrissement en GSH induite par 5 mg/l de sorafenib. Seul le MnTBAP abroge les effets cytostatiques et cytotoxiques de sorafenib sur les lignées cellulaires testées, ce qui implique que l' $O_2^{\cdot -}$ est la principale FRO dont la production est stimulée par le sorafenib, et est responsable, en partie, des propriétés cytostatiques et cytotoxiques du sorafenib.

In vivo, des souris porteuses de tumeurs Hepa 1.6 ont été traitées par le sorafenib seul ou associé au MnTBAP. Les souris traitées avec le sorafenib seul ont présenté des tumeurs significativement plus petites que les souris non traitées (-79%, $p < 0,001$ au 22^{ème} jour). Le MnTBAP seul n'a pas modifié la croissance tumorale alors que l'association du sorafenib à ce mimétique de SOD la diminue de façon significative (-51% au 22^{ème} jour par rapport aux souris non traitées, $P < 0,001$).

Chez l'homme, le dosage de la capacité du serum à oxyder les protéines est un marqueur du stress oxydant (AOPP). Ce paramètre a été mesuré dans le serum de patients traités par sorafenib pour un CHC avancé. Le taux sérique d'AOPP chez les 26 patients est plus élevé sous l'effet du sorafenib ($P < 0,05$). Les patients ont été répartis en deux groupes: un groupe avec une augmentation du delta de l'AOPP inférieure à 0,2 μ M chloramine T équivalent ($< 0,2$ AOPP) ($n = 10$) et un groupe avec une augmentation du delta de l'AOPP supérieure ou égale 0,2 μ M chloramine T équivalent ($\geq 0,2$ AOPP) ($n = 16$). Le delta d'AOPP correspond à l'augmentation du stress oxydant lors de l'introduction du sorafenib (delta AOPP = AOPP à J15 – AOPP à J0). Aucune différence entre les deux groupes, en termes de toxicité du sorafenib, n'a été observée. La meilleure réponse à 3 mois est significativement plus élevée dans le groupe AOPP $\geq 0,2$ μ M par rapport à l'autre groupe, en tenant compte des critères mRECIST (modified Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)[413, 414] et des

critères de Choi [415](critères mRECIST: 30% contre 13%, $p < 0,05$; critères de Choi: 60% versus 13%, $p < 0,01$). La médiane de survie sans progression est significativement plus élevée dans le groupe $\geq 0,2$ AOPP (174 jours (extrêmes: 34-482) que dans le groupe $0,2 < \text{AOPP}$ (50 jours (extrêmes: 9-136) ($P < 0,05$). La survie globale médiane libre est significativement plus élevée dans le groupe $\geq 0,2$ AOPP (315 jours ; extrêmes: 138-1075) que dans le groupe $0,2 < \text{AOPP}$ (191 jours ; extrêmes: 43-705) ($P < 0,05$).

Article 1.

Journal: Molecular cancer Therapeutics (accepté)

Sorafenib-Induced Hepatocellular Carcinoma Cell Death Depends on Reactive Oxygen Species Production *in vitro* and *in vivo*.

Auteurs: Romain Coriat^{1,2,3}, Carole Nicco², Christiane Chéreau², Olivier Mir^{1,3}, Jérôme Alexandre^{1,2,3}, Stanislas Ropert³, Bernard Weill^{1,2}, Stanislas Chaussade^{1,4}, François Goldwasser^{1,2,3}, Frédéric Batteux^{1,2}.

Affiliations des auteurs:

¹ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité, Faculté de Médecine, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP).

² Laboratoire d'immunologie, EA 1833, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité, Faculté de Médecine, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris.

³ CERIA (Centre for Research on Angiogenesis Inhibitors), Medical Oncology department, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France.

³ Service de gastroentérologie, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France.

Discussion

Nous rapportons pour la première fois que le sorafenib présente une activité anti-tumorale véhiculée par un stress oxydant. Cette efficacité est médiée par l'anion superoxyde et se voit partiellement inhibée par un mimétique de la SOD, le MnTBAP.

L'efficacité du sorafenib est décrite dans des lignées cellulaires de CHC. Ce médicament est actuellement le seul traitement validé pour le CHC [404, 416]. La concentration des AOPP dans le sérum des patients traités par le sorafenib apparaît comme un marqueur prédictif de la survie sans progression et de la survie globale. Comme cela avait déjà été objectivé, nous confirmons *in vitro* que le sorafenib exerce des effets cytostatiques et cytotoxiques, dose dépendant, sur les cellules tumorales [404]. Ces effets sont observés sur des lignées cellulaires de CHC et sur les cellules endothéliales. De façon concomitante, le sorafenib induit une augmentation des productions dans les cellules de l'anion superoxyde, du peroxyde d'hydrogène et de l'oxyde nitrique. L'utilisation de modulateurs spécifiques des FRO a mis en évidence que la dismutation des anions superoxydes induite par un mimétique de la SOD (MnTBAP) [417] inhibe l'efficacité du sorafenib alors que ni un inhibiteur de l'H₂O₂, la NAC [418], ni l'inhibiteur de la NO synthase, le L-NAME [419] n'ont d'effet sur la cytotoxicité du sorafenib. Ces données mettent en évidence le rôle prépondérant de l'anion superoxyde dans les effets antiprolifératifs et cytotoxiques du sorafenib. L'anion superoxyde peut interagir avec divers substrats tels que les protéines, les lipides et l'ADN et causer des dommages irréversibles à la cellule [420]. Les effets antiprolifératifs et cytotoxiques directs de l'anion superoxyde ont déjà été observés dans différents types de cellules tumorales [421]. L'anion superoxyde peut provenir de la NADPH oxydase, de la xanthine oxydase ou des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'inhibiteur de la xanthine oxydase, l'allopurinol, et les inhibiteurs des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale, antimycine et roténone, n'ont pas eu d'impact significatif sur la production d'anion superoxyde induite par le sorafenib. L'utilisation du DPI, un inhibiteur de la NADPH oxydase montre clairement que, dans les cellules traitées par le sorafenib, l'O₂^{•-} est produit par la NADPH oxydase. Ces données sont en accord avec le fait que le traitement des cellules de CHC par des inhibiteurs de la NADPH oxydase, y compris le DPI, diminue considérablement à la fois la production de FRO et l'induction de l'apoptose [422]. Ceci suggère que la NADPH

oxydase est la principale source de FRO dans les cellules humaines de CHC [423]. L'activation de la NADPH oxydase peut être directement causée par le sorafenib.

Notre travail met l'accent sur l'implication du stress oxydant dans le traitement des patients par le sorafenib pour un CHC. Ce travail a également mis en évidence un nouveau marqueur sérique permettant d'évaluer l'efficacité du sorafenib. En effet, la concentration de produits d'oxydation des protéines peut être utilisée pour surveiller le stress oxydant *in vivo* chez l'homme [424], car il reflète l'intensité de l'agression oxydative dans diverses conditions pathologiques. Dans notre étude, le niveau initial des AOPP avant tout traitement n'est pas prédictif de l'efficacité du sorafenib. Cependant, l'élévation des AOPP dans le sérum des patients après 15 jours de traitement par sorafenib est significativement corrélée avec l'efficacité clinique du sorafenib. En effet, un taux sérique de l'AOPP $\geq 0,2 \mu\text{M}$ équivalent chloramine T ($\geq 0,2$ AOPP) est corrélée à la fois à la survie sans progression et à la survie globale, suggérant une exposition au produit suffisante. Compte tenu de ces résultats, le dosage sérique des AOPP pourrait devenir un indicateur de l'efficacité du sorafenib.

En conclusion de ce premier travail, l'efficacité du sorafenib est dépendante des FRO et en particulier de la production d' $\text{O}_2^{\bullet-}$. L'effet de cette production sur l'oxydation des protéines est un marqueur précoce de l'efficacité du sorafenib. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que l'efficacité du sorafenib chez les patients présentant un CHC dépend de l'équilibre entre la capacité des cellules tumorales à produire des FRO et leur capacité à tolérer une exposition au sorafenib. Par conséquent, le suivi de la production de FRO induite par le sorafenib est important. En l'absence d'une toxicité limitante, une escalade de dose du sorafenib pourrait être envisagée.

Article 2. La neurotoxicité induite par l'oxaliplatine est prévenue par un mimétique de la SOD, le mangafodipir.

L'oxaliplatine est une des molécules de chimiothérapie les plus largement prescrites en oncologie. Son efficacité est validée chez les patients présentant un cancer colorectal en situation adjuvante et métastatique [425, 426]. Les sels de platine conduisent à la mort cellulaire [427] et à la génération intracellulaire de FRO [428]. L'oxaliplatine interagit également sur le glutathion réduit (GSH) [429] et la déplétion de glutathion est une des voies par lesquelles les sels de platine génèrent des FRO dans des cellules malignes [182, 430].

La neuropathie périphérique est un effet secondaire de l'oxaliplatine qui se produit chez presque 85% des patients exposés à cette chimiothérapie. Cet effet secondaire peut amener à limiter la dose ou la durée de l'administration du médicament [431]. Deux formes cliniques distinctes de neuropathie peuvent être observées. Une neuropathie aiguë immédiate et réversible qui apparaît en quelques heures ou quelques jours [432]. En revanche, les injections itératives d'oxaliplatine conduisent à une neuropathie chronique chez près de 50% des patients [433]. La forme chronique est caractérisée par la persistance de dysesthésies distales et l'apparition d'une dégénérescence axonale distale sensorielle, sans atteinte motrice [434]. Le mécanisme de cette neurotoxicité chronique induite par l'oxaliplatine n'est pas connu. Une hypothèse proposée serait que les effets chroniques de l'oxaliplatine peuvent être secondaires à l'accumulation de platine dans les cellules ganglionnaires de la racine dorsale [435].

Différentes approches thérapeutiques ont été testées afin de prévenir ou d'enrayer la neurotoxicité induite par l'oxaliplatine en utilisant soit des perfusions de calcium ou de magnésium [436], soit des agents neuro-modulateurs [437, 438]. Cependant, aucune de ces tentatives n'a donné des résultats suffisamment importants pour être validé comme traitement de la neuropathie chronique induite par l'oxaliplatine.

La modulation de la formation des FRO induite par l'oxaliplatine est une autre approche thérapeutique qui a été testée cliniquement. En effet, dès 1990, Mollman JE [439] a remarqué que la symptomatologie de la neuropathie induite par un autre sel de platine, le

cisplatine, était cliniquement indiscernable de la neuropathie observée chez les patients présentant un déficit en vitamine E. Comme la vitamine E est un antioxydant agissant au niveau de la membrane neuronale [440], une molécule capable de détoxifier les FRO produites par l'oxaliplatine pourrait prévenir la neurotoxicité des sels de platine. Pour cela, un essai clinique réalisé par Cascinu et al [441] a évalué l'efficacité des injections de glutathion chez les patients traités par l'oxaliplatine. L'efficacité de ce traitement a été limitée probablement en raison d'une incapacité de la GSH à traverser les membranes cellulaires. Pour cela, nous avons entrepris de tester l'inhibition des FRO induites par l'oxaliplatine par le mangafodipir, une molécule dotée de propriétés antioxydantes et capable de pénétrer dans les cellules.

Afin de confirmer notre hypothèse de travail, nous avons d'abord conçu un modèle murin de neuropathie induite par l'oxaliplatine et testé les effets préventifs et curatifs du mangafodipir. Compte tenu des résultats obtenus dans le modèle animal, un essai clinique de phase II a été mis en place chez des patients présentant un cancer métastatique et présentant une neuropathie induite par l'oxaliplatine.

Principaux résultats

Dans un modèle murin de neuropathie, le mangafodipir permet de prévenir la neurotoxicité induite par l'oxaliplatine. Dans ce modèle, la neurotoxicité est évaluée par des tests de marche forcée (rotarod) et de sensibilité (plaque froide et filaments von Frey) des animaux. Les injections intrapéritonéales hebdomadaires d'oxaliplatine à des souris C57BL/6 mâles ont induit une diminution de la sensibilité des animaux dans les 3 tests utilisés. Les injections d'oxaliplatine associées à du mangafodipir ont permis de diminuer significativement la neurotoxicité de l'oxaliplatine, comme le montrent les résultats obtenus aux tests de Rotarod, de sensibilité au froid et au von Frey. Ces résultats plaident pour un effet neuro-protecteur du mangafodipir chez la souris.

Le mangafodipir est l'association d'un chélate de manganèse [II] et d'un dérivé de la vitamine B6, le fodipir. Nous avons exploré séparément l'activité de ces deux composants, à l'aide d'un chélate de manganèse, le MnTBAP et de la vitamine B6. Alors que le MnTBAP empêche l'apparition de la neuropathie, des injections de vitamine B6, en association avec l'oxaliplatine n'a eu aucun effet sur la neuropathie induite par l'oxaliplatine.

L'excitabilité du système neuromusculaire chez les souris a été étudiée *in vivo* pour caractériser les effets de l'oxaliplatine et du mangafodipir. Les différents tests d'excitabilité (stimulus-réponse, durée et seuil des relations de la force-courant et électrotonus de seuil et le cycle de récupération) ont été effectués sur le potentiel d'action musculaire (CMAP) enregistré à partir de muscle plantaire de souris injectées avec du PBS, de l'oxaliplatine, du mangafodipir ou de l'association oxaliplatine + mangafodipir pendant 2 et 4 semaines. Les enregistrements de l'amplitude des CMAP de souris injectées avec soit de l'oxaliplatine, soit du mangafodipir, soit l'association des deux n'ont révélé aucune forme anormale d'ondes d'excitabilité par rapport au groupe PBS. En revanche, les enregistrements après injections d'oxaliplatine ont montré des altérations importantes de l'excitabilité neuromusculaire par rapport au groupe PBS. Ces altérations se composaient de: (i) une diminution de la pente de repos ce qui suggère que les canaux ioniques ont été ouverts avec un potentiel de membrane au repos moindre, (ii) une augmentation des changements de seuil en réponse à la fois à la dépolarisation et à l'hyperpolarisation susceptible d'être causée par une conduction réduite de potassium, et (iii)

une plus grande hyper-excitabilité et une moindre hypo-excitabilité qui reflète, là encore, le dysfonctionnement des canaux potassiques [442]. Ces modifications n'ont pas été détectées dans les enregistrements de souris injectées avec l'oxaliplatine + mangafodipir. De plus, la caractérisation morphologique des effets du mangafodipir sur la neuropathie induite par l'oxaliplatine chez la souris a montré une perte préférentielle des fibres nerveuses myélinisées ou une altération de la myéline.

Un essai clinique de phase II a été conduit afin de confirmer chez l'homme l'effet bénéfique du mangafodipir. Tous les patients présentaient à l'inclusion une neuropathie grade 2 ou plus et une efficacité de l'oxaliplatine. Au total 23 patients ont été inclus et une chimiothérapie à base d'oxaliplatine a été associée au mangafodipir chez 22 patients pour un maximum de 8 cures. L'objectif principal de l'étude (amélioration ou non aggravation de la neuropathie après 4 cycles) a été atteint chez 77% des patients (17 patients sur 22 traités). Le mangafodipir réduit l'incidence de la neuropathie de grade 2 ou plus, chez 7 des 22 patients traités (32%) et cela malgré la poursuite de l'oxaliplatine pendant huit cycles. Au moment de l'inclusion, tous les patients avaient une neuropathie de grade 2 ou plus, alors que six des sept patients ayant reçu les 8 cycles de traitement ne présentaient plus que des neuropathies de grade 0 à 1. Les patients n'ayant pas présenté d'aggravation de leur neuropathie, malgré la poursuite du mangafodipir, sont considérés comme répondeurs. Nous avons observé que les taux d'AOPP étaient plus faibles chez les répondeurs que chez les non-répondeurs ($p < 0,05$). De plus, les niveaux de SOD mesurés dans le serum sont plus élevés chez les répondeurs que chez les non-répondeurs, suggérant une stimulation intense du métabolisme oxydatif dans le groupe des non-répondeurs ($p < 0,05$).

Article 2.

Article soumis

Prevention of Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy by Intravenous Mangafodipir.

Auteurs: Romain Coriat^{1,2}, MD, MSc, Jérôme Alexandre^{1,2}, MD, PhD, Carole Nicco¹, PhD, Laurent Quinquis³, PhD, Evelyne Benoit⁴, PhD, Christiane Chéreau¹, PharmD, Hervé Lemaréchal⁵, PhD, Olivier Mir^{2,6}, MD, MSc, Didier Borderie⁵, PharmD, PhD, Jean-Marc Tréluyer⁶, MD, PhD, Bernard Weill¹, MD, PhD, Joel Coste³, MD, PhD, François Goldwasser^{1,2}, MD, PhD, Frédéric Batteux¹, MD, PhD.

Affiliations des auteurs:

¹ Laboratoire d'immunologie, EA 1833, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP).

² CERIA (Center for Research on Angiogenesis Inhibitors), Medical Oncology Department, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France.

³ Department of Biostatistics, Groupe Hospitalier Broca Cochin Hôtel-Dieu, AP-HP, Paris, France.

⁴ CNRS, Centre de Recherche de Gif-sur-Yvette - FRC3115, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard - FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie et Développement - UPR3294, F-91198 Gif-sur-Yvette, France.

⁵ Biochemistry Laboratory Cochin Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.

⁶ Unité de recherche clinique, URC Cochin, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP).

Prevention of oxaliplatin-Induced peripheral neuropathy by intravenous mangafodipir.

Romain Coriat, Jérôme Alexandre, Carole Nicco, Laurent Quinquis, Evelyne Benoit, Christiane Chéreau, Hervé Lemaréchal, Olivier Mir, Didier Borderie, Jean-Marc Tréluyer, Bernard Weill, Joel Coste, François Goldwasser, Frédéric Batteux

Laboratoire d'immunologie, EA 1833, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) (Dr R Coriat, MD, Prof J Alexandre MD, C. Nicco PhD, C Chéreau Pharm D, Dr B Weill MD, Prof F Goldwasser MD, Prof F Batteux MD);

CERIA (Center for Research on Angiogenesis Inhibitors), Medical Oncology Department, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France (Dr R Coriat, MD, Prof J Alexandre MD, Dr O Mir MD, François Goldwasser MD);

Department of Biostatistics and Epidemiology, Groupe Hospitalier Broca Cochin Hôtel-Dieu, AP-HP, Paris, France (Laurent Quinquis PhD, Prof Joel Coste MD);

CNRS, Centre de Recherche de Gif-sur-Yvette - FRC3115, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard - FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie et Développement - UPR3294, F-91198 Gif-sur-Yvette, France. (Evelyne Benoit PhD)

Biochemistry Laboratory Cochin Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France (Didier Borderie PhD, Hervé Lemaréchal PhD)

Unité de recherche clinique, URC Cochin, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) (Prof JM Tréluyer MD).

Correspondence to : Frédéric Batteux, Laboratoire d'Immunologie, UPRES EA

1833, 24 rue du faubourg St Jacques 75679 Paris cedex 14, France. Tel: +33 (0) 1

58 41 20 09; Fax: +33 (0) 1 58 41 20 08

e-mail: frederic.batteux@cch.aphp.fr; romain.coriat@cch.aphp.fr

Summary

Background Peripheral neuropathy frequently leads to the discontinuation of oxaliplatin-based chemotherapy. Since the neurotoxicity involves the generation of reactive oxygen species, we investigated the therapeutic effects of mangafodipir, a molecule endowed with antioxidant properties, in a mouse model of oxaliplatin-induced neuropathy and in a phase II clinical study.

Methods The neuropathy was induced in mice by oxaliplatin in association or not with mangafodipir. Motility and sensitivity were evaluated using specific devices. Neuromuscular excitability was evaluated by electrophysiological tests. Morphological studies of myelinated axons were performed by confocal laser microscopy.

Twenty-three patients with cancer and oxaliplatin-induced neuropathy of grade 2 or more were enrolled in a phase II study and 22 received intravenous mangafodipir after oxaliplatin. The first end point was the percentage of patients with grade 2 or lower neuropathy at any time during or after oxaliplatin. Advanced oxidized protein products (AOPP) were assayed in the plasma of mice and patients as markers of the oxidative stress.

Findings In mice, mangafodipir totally prevented the onset of motor and sensitive dysfunction, and of demyelinating lesions induced by oxaliplatin. Moreover, plasma AOPP decreased after 4 weeks of mangafodipir.

In 77% patients treated with oxaliplatin and mangafodipir, the neuropathy was improved or stabilized after 4 cycles. After eight cycles, the neuropathy was of grade 2 or less in six of seven patients.

Baseline plasma AOPP were lower in responders than in non-responders.

Interpretation Mangafodipir can prevent or cure the peripheral neuropathy induced by oxaliplatin through its antioxidant properties.

Funding Université Paris Descartes, Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, Protexel SAS.

Discussion

Cette étude montre que l'association du mangafodipir avec de l'oxaliplatine peut prévenir la neurotoxicité induite par l'oxaliplatine dans un modèle murin mais également chez les patients présentant une neuropathie de grade 2 ou plus, induite par l'oxaliplatine. La neurotoxicité sévère étant la principale cause d'arrêt de l'oxaliplatine [425, 457, 458], nos résultats peuvent être considérés comme une avancée majeure dans le traitement des patients recevant une chimiothérapie à base d'oxaliplatine.

Tous les tests fonctionnels réalisés dans notre modèle murin de neuropathie ont confirmé que ce mimétique de SOD prévient efficacement l'apparition de troubles sensitifs induits par l'oxaliplatine. Par ailleurs, nos analyses morphologiques ont révélé une diminution du diamètre des fibres nerveuses myélinisées lors d'un traitement par oxaliplatine. L'implication des grandes fibres est une caractéristique bien connue de la neurotoxicité induite par les sels de platine [449, 459-461].

Les souris traitées avec de l'oxaliplatine présentent une élévation des taux plasmatiques d'AOPP probablement représentatifs de l'activité pro-oxydante de la drogue. Comme le mangafodipir, le MnTBAP est un chélate de manganèse pouvu d'une activité de type SOD, mais il est dépourvu d'activité vitamine B6 [346]. Nous avons constaté dans notre modèle murin, que le MnTBAP peut empêcher l'hyperexcitabilité neuromusculaire tandis que la vitamine B6 seule n'est pas efficace. Ces données sont conformes à celles publiées par Ang et al. concernant la neuropathie périphérique traitée par les complexes de la vitamine B [453]. Par conséquent, nos résultats suggèrent que le mangafodipir empêche la neuropathie induite par l'oxaliplatine chez la souris par une diminution de la concentration des FRO grâce à son activité SOD, protégeant ainsi les gaines de myéline des axones.

Compte tenu des résultats encourageants obtenus dans le modèle animal, un essai clinique a été conçu, visant à étudier l'action du mangafodipir sur le statut redox des patients traités par oxaliplatine et son effet curatif sur la neurotoxicité. Le mangafodipir a prouvé son

efficacité dans la stabilisation voire l'amélioration de la neuropathie pour 77% des patients recevant plus de quatre cycles de chimiothérapie à base d'oxaliplatine.

Notre étude met également en avant une augmentation significative du nombre de polynucléaires neutrophiles lors du traitement par mangafodipir + oxaliplatine. Ce résultat conforte des résultats précédemment obtenus par le laboratoire et par d'autres équipes, sur l'effet protecteur du mangafodipir sur les cellules non tumorales [346, 347, 359, 360]. Il avait d'ailleurs été mis en évidence que le mangafodipir pouvait protéger les cellules normales du stress oxydant induit par l'oxaliplatine [345] sans supprimer l'effet anticancéreux de la drogue [182, 345].

Nous avons aussi montré dans cette étude que le taux plasmatique moyen des AOPP était plus élevé chez les patients non répondeurs, ce qui suggère un niveau de stress oxydant basal plus élevé, qui pourrait expliquer une inefficacité du mangafodipir en raison d'une exposition au produit insuffisante. Compte tenu des propriétés anti-oxydantes du mangafodipir et de l'évaluation par un marqueur de FRO dans le sérum des patients (la concentration plasmatique des AOPP), nos données plaident en faveur de l'utilisation des AOPP comme un marqueur prédictif d'efficacité du mangafodipir dans la prévention de la neuropathie induite par l'oxaliplatine.

En conclusion, le mangafodipir est actuellement le seul médicament qui, dans près de 77% des cas, peut prévenir l'aggravation de la neuropathie induite par l'oxaliplatine et permettre la poursuite de l'utilisation de cette chimiothérapie. Par conséquent, le mangafodipir devrait être considéré comme une option thérapeutique, chez les patients présentant une neuropathie induite par l'oxaliplatine de grade 2 lorsque l'oxaliplatine reste efficace contre la tumeur.

Article 3 et 4. L'optimisation thérapeutique en oncologie avec le développement d'une nouvelle classe pharmacologique de modulateurs du stress oxydant, les organochalcogènes.

L'implication des FRO dans le métabolisme des cellules tumorales est majeure. La plupart des médicaments anticancéreux ont une activité anti-tumorale résultant en partie de la production d'une grande quantité de FRO intracellulaires qui stimulent les voies de signalisation pro-apoptotiques [462]. Plusieurs agents anticancéreux, tels que le 5-fluorouracile [306], les sels de platine [463, 464], l'As₂O₃ [271], le paclitaxel [273], et les anthracyclines [345] augmentent les niveaux intracellulaires de FRO. Les cellules tumorales présentent un taux basal de FRO plus élevé que les cellules normales et sont ainsi plus sensibles au stress oxydant additionnel causé par les agents anticancéreux [463, 465].

Plusieurs stratégies utilisant la forte concentration intrinsèque des FRO afin de cibler sélectivement les tumeurs sans endommager les tissus sains ont été proposées. Les agents tels que les quinones augmentent les niveaux de FRO dans la cellules [466]. Les mimétiques de la SOD, comme par exemple le mangafodipir, présente une activité anti-tumorale à la fois seule et en association avec des molécules de chimiothérapies [345]. Les catalyseurs à base de chalcogène, en présence de niveaux élevés de FRO, ont une efficacité cytotoxique sur des cellules tumorales *in vitro* [467-469].

Dans le cadre d'une collaboration européenne nous avons pu tester les effets de nouveaux catalyseurs, les chalcogènes. Nous avons utilisé des organochalcogènes pour étudier leurs effets sur des cellules tumorales provenant de cellules leucémiques myéloïdes (K562), de carcinome colorectal (HT29), de cancer du poumon (A549), ou de cancer du sein (MCF7). La toxicité des molécules a été comparée avec celle observée dans des cellules normales non transformées d'endothélium humain (HUVEC) ou des fibroblastes (NIH 3T3). De plus, nous avons évalué l'effet anti-tumoral de ces molécules en association à des molécules de chimiothérapie.

L'efficacité de nouvelles molécules anticancéreuses par leurs effets sur le stress oxydant nécessite la présence de catalyseurs qui augmentent les FRO intracellulaires à un niveau létal pour la cellule tumorale [465]. Les composés qui contiennent des quinones et le tellure sont cytotoxiques à de faibles concentrations [286]. Le composé LAB027 qui associe un noyau quinone ainsi que deux atomes de tellure peut être considéré comme le prototype pro-oxydant des composés du tellure.

Les cellules cancéreuses du côlon sont très sensibles au stress oxydant [1] et sont actuellement traités par le 5-FU, l'oxaliplatine et de l'irinotécan, générateurs de stress oxydant intracellulaire dans les cellules cancéreuses. Nous avons étudié l'activité anti-tumorale d'une molécule appelée LAB027, un organotelluride, seule ou associée à l'oxaliplatine. En raison du potentiel thérapeutique de ce composé, une évaluation de son profil de toxicité a également été réalisée.

Principaux résultats

La synthèse de 10 molécules appartenant à la famille des quinones-chalcogènes a été réalisée par des équipes de chimistes du réseau Redcat. Les composés appelés 3 et 6 présentaient une activité anti-tumorale sur des cellules de tumeur colique (HT29), pulmonaire (A549) et de cancer du sein (MCF7). La dose létale pour 50% des cellules (DL50) varie entre 0,3 et 0,625 μM pour le composé 6 dans toutes les lignées cellulaires de carcinome évaluées. En revanche, la DL50 pour le composé 6 dans les deux lignées de cellules non transformées (NIH 3T3 de fibroblastes ou des cellules endothéliales HUVEC) était supérieure à 1,25 μM . Des résultats semblables ont été obtenus avec le composé 3 sauf pour les cellules du cancer du côlon HT29 qui étaient plus résistantes, avec une DL50 de 2,5 μM . Ces résultats nous ont conduits à utiliser le composé 6 pour les tests de synergie avec des molécules de chimiothérapie. L'association du composé 6 avec le 5-fluorouracile (5-FU) et l'irinotécan a été réalisée *in vitro* sur une lignée de cancer colique humain (HT29).

L'irinotécan à 15 μM , le 5-FU à 200 μM , et le composé 6 à 2 μM en monothérapie présentent un effet cytotoxique comparable. En association avec le composé 6, l'efficacité anti-tumorale de l'irinotécan augmente par rapport à l'irinotécan seul. Un effet identique est constaté avec le 5-FU. En revanche, le composé 6 ne potentialise pas les effets cytotoxiques sur les cellules normales testées (NIH 3T3 et HUVEC). Ces données renforcent l'idée que les modulateurs de FRO sont susceptibles de causer des lésions sur les cellules tumorales tout en préservant les cellules non tumorales.

Le LAB027 appartient à la famille des organochalcogènes. *In vitro*, dans des lignées murines de cancer colique (CT26) et humaine (HT29), le LAB027 induit de manière dose dépendante une augmentation de la production d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ (CT26: $P < 0,05$ avec 2 μM de LAB027; HT29: $P < 0,05$ avec 1 μM de LAB027). Une augmentation dose dépendante de la production de l' H_2O_2 a également été observée (CT26: $P < 0,05$ avec 2 μM de LAB027; HT29: $P < 0,05$ avec 2 μM de LAB027). L'incubation des fibroblastes NIH3T3 avec des quantités croissantes de LAB027 n'a eu aucun effet sur la production d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ ($P = \text{NS}$). En revanche, l'incubation des fibroblastes NIH3T3 avec des quantités croissantes de LAB027 a entraîné une augmentation de la production de l' H_2O_2 ($P < 0,05$ avec 1 μM de LAB027).

In vitro, l'incubation des cellules HT29 ou CT26 avec des quantités croissantes de LAB027 ne modifie pas significativement les activités SOD, catalase et glutathion réductase par rapport aux cellules non traitées. En revanche, l'incubation de fibroblastes NIH 3T3 avec des quantités croissantes de LAB027 stimule l'activité SOD ($P < 0,001$ pour NIH 3T3 avec $4 \mu\text{M}$ LAB027) et l'activité glutathion réductase ($P < 0,001$ pour NIH 3T3 avec $4 \mu\text{M}$ LAB027) par rapport à des cellules non traitées. De plus, aucun effet n'est observé sur l'activité catalase.

L'incubation des cellules tumorales, HT29 ou CT26, ou normales, NIH 3T3 ou W138, avec des quantités croissantes de LAB027 diminue leur taux de prolifération et leur viabilité. Le LAB027 a des effets significativement plus cytostatique et cytotoxique dans les cellules tumorales que dans les cellules non tumorales. L'incubation de BSO, un inhibiteur de gamma-synthétase glutamylcystéine, avec le LAB027 épuise le GSH intracellulaire et augmente la cytotoxicité du LAB027 dans toutes les lignées cellulaires. En revanche, le blocage de la catalase par un aminotriazole ou l'augmentation de ses niveaux intracellulaires par incubation avec une PEG-catalase n'a aucun effet sur la survie ou la prolifération cellulaire quel que soit le type cellulaire considéré.

Afin de clarifier le type de mort cellulaire, nous avons utilisé des marqueurs tels que l'iodure de propidium (IP) et le YOPRO-1 sur les cellules HT29 traitées par du LAB027. Après une incubation de 24h avec $4 \mu\text{M}$ de LAB027, un processus nécrotique a été mis en évidence dans les cellules HT29 avec 5% de cellules positives au YOPRO-1 seul et 33% positives au IP et au YOPRO-1. Une analyse de la cinétique de la mort cellulaire entre 6 et 24 heures a montré que le LAB027 induit la mort cellulaire principalement par le biais d'un processus nécrotique.

In vitro le LAB027 agit en synergie avec l'oxaliplatine pour activer la production de FRO. L'incubation des cellules avec l'oxaliplatine et le LAB027 induit une augmentation de la production de H_2O_2 de 323% pour les cellules CT26 et de 1215% pour les cellules HT29. L'incubation de cellules CT26, HT29 ou NIH3T3 avec de l'oxaliplatine et du LAB027 n'influence pas la production de $\text{l'O}_2^{\bullet-}$ par rapport à l'oxaliplatine seule.

L'incubation de l'oxaliplatine et du LAB027 avec le BSO qui épuise les cellules en glutathion réduit, augmente de façon significative le potentiel anti prolifératif de l'association oxaliplatine + LAB027 dans toutes les lignées cellulaires ($P < 0,001$). De plus, l'incubation avec la NAC, un précurseur du glutathion, augmente de façon significative la prolifération cellulaire ($P < 0,001$ pour HT29 et CT26 et $P < 0,05$ pour 3T3).

Afin de déterminer si le LAB027 peut inhiber la croissance tumorale *in vivo*, nous avons traité des souris portant des tumeurs sous-cutanées (CT26) soit avec de l'oxaliplatine, soit avec du LAB027, soit avec l'association de ces deux molécules. Les souris traitées avec l'oxaliplatine seule ont développé des tumeurs significativement plus petites que les souris non traitées. Le LAB027 inhibe la croissance tumorale lorsqu'il est administré seul. L'administration du LAB027 amplifie l'effet anti-tumoral de l'oxaliplatine. Afin de déterminer si le système immunitaire joue un rôle dans les effets anti-tumoraux induits par le LAB027, nous avons réalisé la même expérience en utilisant des souris SCID immunodéficientes. Chez les souris SCID portant les mêmes tumeurs sous-cutanées (CT26), des résultats identiques ont été obtenus, mettant en évidence l'absence de rôle du système immunitaire dans l'efficacité anti-tumorale du LAB027.

In vivo, le LAB027 seul n'a pas induit de toxicité hématologique par rapport aux souris témoins non traitées. L'administration de LAB027 en association avec de l'oxaliplatine diminue significativement la toxicité hématologique de l'oxaliplatine. En effet, le nombre de leucocytes périphériques ($P = 0,027$), des neutrophiles ($P = 0,008$) et des plaquettes ($P = 0,035$) est plus élevé dans le sang des souris traitées avec du LAB027 et de l'oxaliplatine que dans le sang des souris traitées avec de l'oxaliplatine seule. L'infection bactérienne étant la principale complication de la neutropénie, la sensibilité des souris à l'inoculation intrapéritonéale de *E. coli* a été testée après l'administration d'oxaliplatine seule ou en association avec du LAB027. Quarante pour cent des souris témoins traitées avec du PBS ont survécu 28 heures après l'inoculation d'*E. coli*. Aucun animal traité avec de l'oxaliplatine n'a survécu plus de 22 heures après l'inoculation. En revanche, 55% des souris traitées avec de l'oxaliplatine et du LAB027 ont survécu 28 heures après l'inoculation ($P = 0,044$).

Article 3.

Journal: Journal of Medicinal Chemistry (accepté)

Synthesis and Selective Anticancer Activity of Organochalcogen Based Redox Catalysts.

Auteurs: Mandy Doering,^{†,#} Lalla A. Ba,^{†,#} Nils Lilienthal,^{‡,#} Carole Nicco,[§] Christiane Scherer,[†], Muhammad Abbas,[†] Abdul Ali Peer Zada,[‡] **Romain Coriat**,[§] Torsten Burkholz,[†] Ludger Wessjohann,[^] Marc Diederich, Frederic Batteux,^{*,§} Marco Herling,^{*,‡} and Claus Jacob^{*,†}

Affiliations des auteurs:

[†]Division of Bioorganic Chemistry, School of Pharmacy, Saarland University, D-66123 Saarbruecken, Germany,

[‡]Department of Internal Medicine I, Cologne University, 50924 Cologne, Germany,

[§]Laboratoire d'Immunologie, EA1833, Université Paris Descartes, Institut Fédératif de Recherche Alfred Jost, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, 75679 Paris Cedex 14, France,

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, Luxembourg,

[^]Department of Bioorganic Chemistry, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Martin-Luther University, Halle/Saale, Germany.

Article 4.

Journal: Cell Death and Disease (accepté)

The Organotelluride Catalyst LAB027 prevents Colon Cancer Growth in the Mice.

Authors: Romain Coriat¹, Wioleta Marut¹, Mahaut Leconte¹, Lalla B. Ba², Ariane Vienne¹, Christiane Chéreau¹, Jérôme Alexandre¹, Bernard Weill¹, Mandy Doering², Claus Jacob², Carole Nicco¹, Frédéric Batteux¹

Affiliations des auteurs:

¹ Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Laboratoire d'immunologie, EA 1833, Paris.

² Division of Bioorganic Chemistry, School of Pharmacy, Saarland University, PO Box 151150, D-66123, Saarbruecken, Germany.

Discussion

Cette étude montre pour la première fois l'efficacité anti-tumorale d'une nouvelle classe thérapeutique de molécules, utilisée seule ou en association à de la chimiothérapie. Le troisième article de ce rapport montre qu'il est possible de synthétiser des catalyseurs d'oxydo-réduction destinés à moduler le niveau intracellulaire des FRO préférentiellement dans les cellules cancéreuses. Ces composés contiennent des tellures qui sont utilisés pour la première fois dans nos travaux et présentent un potentiel antitumoral majeur. L'activité biologique de ces composés est liée à la modulation redox et permet l'induction d'un processus apoptotique et nécrotique dans les cellules tumorales. Le développement des organotellurides soulève un grand nombre de questions qui doivent être poursuivies dans le futur. En effet, si cette nouvelle classe médicamenteuse semble prometteuse *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin, une confirmation de l'inocuité de cette classe médicamenteuse et de son efficacité anti-tumorale reste à valider chez l'homme.

Dans notre travail, nous avons étudié plus en détail l'efficacité et l'éventuel développement en oncologie d'un des composés d'organotellurides, le catalyseur organotelluride LAB027. Le 4^{ème} article de cette thèse apporte une valeur préclinique au rôle majeur que va pouvoir jouer le LAB027 seul ou en association avec l'oxaliplatine. Le LAB027 pourrait donc être la première molécule évaluée chez l'homme.

Des expériences antérieures ont montré que les modulateurs du stress oxydant peuvent agir comme des molécules cytotoxiques *in vitro* [470]. *In vitro*, les cellules tumorales présentent un niveau basal élevé de FRO qui est amplifié par le LAB027 afin de générer un burst oxydatif létal. L'explication la plus probable de cet effet d'amplification est une association des FRO à la quinone et l'oxydation des thiols cellulaires catalysés par le tellure en présence de l'H₂O₂. Ces réactions chimiques sont susceptibles d'augmenter le stress oxydant dans les cellules tumorales [286]. En effet, dans ces cellules, les niveaux d'activité des enzymes antioxydantes sont faibles et non modifiés par le LAB027. Dans les cellules normales, les niveaux de base de l'activité des enzymes anti-oxydantes sont plus élevés et sont encore augmentés par le LAB027, empêchant ainsi la mort cellulaire [463]. Cela explique aussi les différences de toxicité du composé LAB027 dans les cellules tumorales et normales.

Le LAB027 induit un stress oxydant qui est amplifié par le stress oxydant préexistant dans les cellules tumorales. L' H_2O_2 et l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ jouent un rôle clé dans la mort induite par le LAB027 car la N-acétylcystéine, ou le mimétique de la SOD, MnTBAP, diminuent de manière significative la toxicité du LAB027. L'incubation de LAB027 avec le BSO, un inhibiteur de la gamma-glutamylcystéine synthétase qui épuise les cellules en glutathion réduit, augmente la cytotoxicité du LAB027 dans toutes les lignées cellulaires. Les inhibiteurs de catalase n'ayant aucun effet sur la production et la toxicité des FRO, ces résultats indiquent la toxicité du LAB027 est contrôlée par la voie du glutathion plutôt que par la voie de la catalase.

L'augmentation des effets antiprolifératifs de l'oxaliplatine sur les cellules du cancer du côlon lorsqu'elle est associée au LAB027, est liée à l'augmentation de la concentration intracellulaire de H_2O_2 . En raison de son rôle dans la détoxification de H_2O_2 , la voie du glutathion représente une composante majeure de la défense cellulaire contre les drogues cytotoxiques comme l'oxaliplatine. Nos données confirment que l'oxaliplatine exerce ses effets anti-tumoraux, au moins en partie par l'induction d'un stress oxydant, et mettent l'accent sur le rôle du glutathion réduit dans le contrôle de la cytotoxicité induite par l'oxaliplatine [98].

Nous avons déjà observé que le mangafodipir comme le LAB027 empêche la toxicité hématologique de l'oxaliplatine et renforce son activité anti-tumorale contre le cancer du côlon à la fois *in vitro* et *in vivo* [345]. Le mangafodipir induit une surproduction de H_2O_2 par la dismutation de l'anion superoxyde, mais diminue la toxicité de l' H_2O_2 dans les cellules normales grâce à son activité glutathion réductase. Le mangafodipir et le LAB027 augmentent l'index thérapeutique de l'oxaliplatine *in vitro* et *in vivo*, et préviennent la toxicité hématologique et la mort des animaux injectés avec une concentration létale de bactéries [345, 471].

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre travail a permis de mettre en évidence l'intérêt thérapeutique potentiel des modulateurs du stress oxydant seuls ou en association avec des cytotoxiques anti-tumoraux. Nous avons d'abord confirmé l'effet majeur des FRO dans l'activité anti-tumorale. Cette induction d'un stress oxydant a également été mise en évidence avec les inhibiteurs de tyrosine kinases. Le sorafenib, un inhibiteur de tyrosine kinases, nous a permis d'identifier les AOPP comme marqueur précoce d'efficacité de ce traitement. Ces résultats doivent être confirmés lors d'un essai prospectif randomisé pour pouvoir à l'avenir surveiller l'efficacité du sorafenib par ce marqueur sérique de stress oxydant.

Nous avons montré que les cellules tumorales sont soumises à un stress oxydant intense, proche du seuil toxique, les rendant plus sensibles que les cellules normales à des composés capables d'augmenter la concentration intracellulaire de peroxyde d'hydrogène. Un mimétique de la SOD, le mangafodipir, augmente l'effet anti-tumoral de la chimiothérapie à base d'oxaliplatine et diminue la neurotoxicité induite. Cet effet pharmacoprotecteur du mangafodipir passe par une diminution du burst oxydatif au niveau des gaines de myéline préservant l'atteinte axonale et les canaux potassiques. Cet effet pharmacoprotecteur a pu être confirmé chez l'homme permettant de poursuivre le traitement par l'oxaliplatine et d'améliorer la neurotoxicité dans une partie des cas. Le mangafodipir apparaît comme une molécule non toxique avec un effet anti-tumoral identifié et une activité pharmacoprotectrice. Ces résultats permettent d'envisager un développement en oncologie de cette molécule comme traitement en association à la chimiothérapie.

Nous avons finalement cherché à potentialiser l'effet anti-tumoral de cytotoxiques en développant une nouvelle classe médicamenteuse, les organotellurides. Ces modulateurs du stress oxydant apparaissent comme une classe thérapeutique prometteuse avec une efficacité anti-tumorale en monothérapie et un effet cumulatif avec les molécules de chimiothérapie couramment utilisées comme le 5-fluoro uracile, l'irinotecan et l'oxaliplatine. Dans tous les cas, ces molécules ont des effets notoires sur les cellules tumorales contrairement à ce qui est observé dans les cellules normales, faisant envisager un effet pharmacoprotecteur de cette

classe thérapeutique. Ces résultats encourageants, principalement avec le LAB027, méritent une confirmation chez l'homme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 579-591.
2. Gutteridge JM, Halliwell B. Comments on review of *Free Radicals in Biology and Medicine*, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 93-95.
3. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 501-514.
4. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999; 31: 261-272.
5. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Hum Toxicol* 1988; 7: 7-13.
6. Sies H. Biological redox systems and oxidative stress. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 2181-2188.
7. Alexandre J, Batteux F, Nicco C et al. Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2006; 119: 41-48.
8. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142: 231-255.
9. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005; 120: 483-495.
10. Marla SS, Lee J, Groves JT. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 14243-14248.
11. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 361-374.
12. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
13. Henzler T, Steudle E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H_2O_2 across water channels. *J Exp Bot* 2000; 51: 2053-2066.
14. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem* 2002; 91: 9-18.
15. Kadiiska MB, Mason RP. In vivo copper-mediated free radical production: an ESR spin-trapping study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2002; 58: 1227-1239.
16. Marusawa H, Ichikawa K, Narita N et al. Hydroxyl radical as a strong electrophilic species. *Bioorg Med Chem* 2002; 10: 2283-2290.
17. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 1986; 48: 657-667.
18. Droge W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol* 2002; 37: 1333-1345.
19. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
20. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L1005-1028.

21. Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R et al. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 2000; 27: 469-474.
22. Freeman BA, Crapo JD. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem* 1981; 256: 10986-10992.
23. Miyazaki I, Asanuma M. Approaches to prevent dopamine quinone-induced neurotoxicity. *Neurochem Res* 2009; 34: 698-706.
24. Miyazaki I, Asanuma M. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med Okayama* 2008; 62: 141-150.
25. Hwang I, Lee J, Huh JY et al. Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. *Diabetes* 2012; 61: 728-738.
26. Slaughter RL, Edwards DJ. Recent advances: the cytochrome P450 enzymes. *Ann Pharmacother* 1995; 29: 619-624.
27. Rapoport R, Sklan D, Hanukoglu I. Electron leakage from the adrenal cortex mitochondrial P450_{scc} and P450_{c11} systems: NADPH and steroid dependence. *Arch Biochem Biophys* 1995; 317: 412-416.
28. Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 1969; 244: 3855-3863.
29. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 774-797.
30. Ono T, Tsuruta R, Fujita M et al. Xanthine oxidase is one of the major sources of superoxide anion radicals in blood after reperfusion in rats with forebrain ischemia/reperfusion. *Brain Res* 2009; 1305: 158-167.
31. Hakguder G, Akgur FM, Ates O et al. Short-term intestinal ischemia-reperfusion alters intestinal motility that can be preserved by xanthine oxidase inhibition. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1279-1283.
32. Canas PE. The role of xanthine oxidase and the effects of antioxidants in ischemia reperfusion cell injury. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 1999; 49: 13-20.
33. Wakatsuki A, Okatani Y, Izumiya C, Ikenoue N. Effect of ischemia-reperfusion on xanthine oxidase activity in fetal rat brain capillaries. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181: 731-735.
34. Nishino T, Okamoto K, Eger BT et al. Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *Febs J* 2008; 275: 3278-3289.
35. Hille R, Nishino T. Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *Faseb J* 1995; 9: 995-1003.
36. Becuwe P, Bianchi A, Didelot C et al. Arachidonic acid activates a functional AP-1 and an inactive NF-kappaB complex in human HepG2 hepatoma cells. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 636-647.
37. Bianchi A, Becuwe P, Franck P, Dauca M. Induction of MnSOD gene by arachidonic acid is mediated by reactive oxygen species and p38 MAPK signaling pathway in human HepG2 hepatoma cells. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 1132-1142.
38. Leto TL, Geiszt M. Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1549-1561.
39. Geiszt M, Lekstrom K, Leto TL. Analysis of mRNA transcripts from the NAD(P)H oxidase 1 (Nox1) gene. Evidence against production of the NADPH oxidase homolog-1 short (NOH-1S) transcript variant. *J Biol Chem* 2004; 279: 51661-51668.
40. Geiszt M, Leto TL. The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J Biol Chem* 2004; 279: 51715-51718.

41. Werner E. GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci* 2004; 117: 143-153.
42. Altenhofer S, Kleikers PW, Radermacher KA et al. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69: 2327-2343.
43. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 181-189.
44. Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 319-331.
45. Banfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem* 2003; 278: 3510-3513.
46. Hilenski LL, Clempus RE, Quinn MT et al. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 677-683.
47. Li H, Han W, Villar VA et al. D1-like receptors regulate NADPH oxidase activity and subunit expression in lipid raft microdomains of renal proximal tubule cells. *Hypertension* 2009; 53: 1054-1061.
48. Petry A, Djordjevic T, Weitnauer M et al. NOX2 and NOX4 mediate proliferative response in endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1473-1484.
49. Kuroda J, Nakagawa K, Yamasaki T et al. The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes Cells* 2005; 10: 1139-1151.
50. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86: 494-501.
51. Sorescu D, Griendling KK. Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. *Congest Heart Fail* 2002; 8: 132-140.
52. Sorescu D, Weiss D, Lassegue B et al. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1429-1435.
53. Lambeth JD, Krause KH, Clark RA. NOX enzymes as novel targets for drug development. *Semin Immunopathol* 2008; 30: 339-363.
54. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ et al. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* 2002; 347: 95-102.
55. Lassegue B, Sorescu D, Szocs K et al. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 2001; 88: 888-894.
56. Wingler K, Wunsch S, Kreutz R et al. Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1456-1464.
57. Mahadev K, Motoshima H, Wu X et al. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 1844-1854.
58. Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ et al. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11848-11852.
59. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ et al. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995; 270: 296-299.
60. Takeya R, Sumimoto H. Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Mol Cells* 2003; 16: 271-277.
61. Kanai F, Liu H, Field SJ et al. The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 675-678.

62. Groemping Y, Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* 2005; 386: 401-416.
63. Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD. The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem* 1999; 274: 22999-23005.
64. Koga H, Terasawa H, Nunoi H et al. Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1999; 274: 25051-25060.
65. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 1990; 348: 125-132.
66. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991; 349: 117-127.
67. Kwong CH, Malech HL, Rotrosen D, Leto TL. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by rho-related G-proteins. *Biochemistry* 1993; 32: 5711-5717.
68. Dusi S, Donini M, Rossi F. Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47phox or p67phox. *Biochem J* 1996; 314 (Pt 2): 409-412.
69. Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* 2002; 41: 7743-7750.
70. Dewas C, Fay M, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. *J Immunol* 2000; 165: 5238-5244.
71. Knaus UG, Morris S, Dong HJ et al. Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein--coupled receptors. *Science* 1995; 269: 221-223.
72. Hoyal CR, Gutierrez A, Young BM et al. Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5130-5135.
73. Abo A, Pick E, Hall A et al. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 1991; 353: 668-670.
74. Nisimoto Y, Freeman JL, Motalebi SA et al. Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 1997; 272: 18834-18841.
75. Kreck ML, Freeman JL, Abo A, Lambeth JD. Membrane association of Rac is required for high activity of the respiratory burst oxidase. *Biochemistry* 1996; 35: 15683-15692.
76. Rinckel LA, Faris SL, Hitt ND, Kleinberg ME. Rac1 disrupts p67phox/p40phox binding: a novel role for Rac in NADPH oxidase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 118-122.
77. Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res* 2002; 509: 127-151.
78. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002; 277: 44784-44790.
79. Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* 2002; 368: 545-553.

80. Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 1980; 191: 421-427.
81. Miwa S, St-Pierre J, Partridge L, Brand MD. Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 938-948.
82. Pelicano H, Feng L, Zhou Y et al. Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J Biol Chem* 2003; 278: 37832-37839.
83. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961; 191: 144-148.
84. Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1972; 128: 617-630.
85. Valdez LB, Zdoborniy T, Boveris A. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757: 166-172.
86. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 1997; 416: 15-18.
87. Skulachev VP. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett* 1996; 397: 7-10.
88. Skulachev VP. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q Rev Biophys* 1996; 29: 169-202.
89. Servais S, Couturier K, Koubi H et al. Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 24-32.
90. Herrero A, Barja G. Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech Ageing Dev* 1997; 98: 95-111.
91. Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* 1999; 31: 347-366.
92. Liu FQ, Zhang JR. Effect of NADH against liver cell line L02 apoptosis induced by UVB irradiation. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2002; 22: 232-234 (Abstract).
93. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S et al. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 2003; 278: 36027-36031.
94. Beal MF. Less stress, longer life. *Nat Med* 2005; 11: 598-599.
95. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009; 417: 1-13.
96. Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* 2012; 441: 523-540.
97. Ballinger SW, Patterson C, Yan CN et al. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res* 2000; 86: 960-966.
98. Azad MB, Chen Y, Gibson SB. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 777-790.
99. Scherz-Shouval R, Elazar Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* 2007; 17: 422-427.
100. Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci* 2011; 36: 30-38.

101. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E et al. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *Embo J* 2007; 26: 1749-1760.
102. Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem* 1997; 174: 305-319.
103. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006; 443: 787-795.
104. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239-247.
105. Raj L, Ide T, Gurkar AU et al. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature* 2012; 475: 231-234.
106. Divakaruni AS, Brand MD. The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology (Bethesda)* 2011; 26: 192-205.
107. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 2011; 435: 297-312.
108. Fontaine EM, Moussa M, Devin A et al. Effect of polyunsaturated fatty acids deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1276: 181-187.
109. Pehowich DJ. Thyroid hormone status and membrane n-3 fatty acid content influence mitochondrial proton leak. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 192-200.
110. Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G et al. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J* 1997; 11: 809-815.
111. Vidal-Puig AJ. Uncoupling expectations. *Nat Genet* 2000; 26: 387-388.
112. Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY et al. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* 2000; 275: 16258-16266.
113. Skulachev VP. Biochemical mechanisms of evolution and the role of oxygen. *Biochemistry (Mosc)* 1998; 63: 1335-1343.
114. Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1363: 100-124.
115. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C et al. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* 2000; 26: 435-439.
116. Echtay KS, Murphy MP, Smith RA et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. *J Biol Chem* 2002; 277: 47129-47135.
117. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 2002; 415: 96-99.
118. Echtay KS, Winkler E, Frischmuth K, Klingenberg M. Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1416-1421.
119. van Dam K, Shinohara Y, Unami A et al. Slipping pumps or proton leaks in oxidative phosphorylation. The local anesthetic bupivacaine causes slip in cytochrome c oxidase of mitochondria. *FEBS Lett* 1990; 277: 131-133.
120. Pietrobon D, Zoratti M, Azzone GF. Molecular slipping in redox and ATPase H⁺ pumps. *Biochim Biophys Acta* 1983; 723: 317-321.
121. Azzone GF, Pietrobon D, Walz D. The molecular slipping in the redox-driven H⁺ pumps. *Adv Exp Med Biol* 1982; 148: 187-194.
122. Azzone GF, Zoratti M, Petronilli V, Pietrobon D. The stoichiometry of H⁺ pumping in cytochrome oxidase and the mechanism of uncoupling. *J Inorg Biochem* 1985; 23: 349-356.

123. Fontaine EM, Devin A, Rigoulet M, Leverve XM. The yield of oxidative phosphorylation is controlled both by force and flux. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232: 532-535.
124. Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1604: 77-94.
125. Shiva S, Moellering D, Ramachandran A et al. Redox signalling: from nitric oxide to oxidized lipids. *Biochem Soc Symp* 2004; 107-120.
126. Sarti P, Arese M, Forte E et al. Mitochondria and nitric oxide: chemistry and pathophysiology. *Adv Exp Med Biol* 2011; 942: 75-92.
127. Ullrich V, Schildknecht S. Sensing Hypoxia by Mitochondria: A Unifying Hypothesis Involving S-nitrosation. *Antioxid Redox Signal* 2012.
128. Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 2011; 94: 166-200.
129. Bohr VA. DNA-related pathways defective in human premature aging. *ScientificWorldJournal* 2002; 2: 1216-1226.
130. Stevnsner T, Nyaga S, de Souza-Pinto NC et al. Mitochondrial repair of 8-oxoguanine is deficient in Cockayne syndrome group B. *Oncogene* 2002; 21: 8675-8682.
131. Bohr VA, Stevnsner T, de Souza-Pinto NC. Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene* 2002; 286: 127-134.
132. Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL et al. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *Embo J* 2003; 22: 4103-4110.
133. Considine MJ, Goodman M, Echtay KS et al. Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein. *J Biol Chem* 2003; 278: 22298-22302.
134. Ookawara T, Eguchi H, Nishimura M et al. Effects of oxidative stress on the nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303: 914-919.
135. Ookawara T, Kizaki T, Takayama E et al. Nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 54-61.
136. Mates JM, Segura JM, Perez-Gomez C et al. Antioxidant enzymatic activities in human blood cells after an allergic reaction to pollen or house dust mite. *Blood Cells Mol Dis* 1999; 25: 103-109.
137. Folz RJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. *Genomics* 1994; 22: 162-171.
138. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9782-9787.
139. Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 1996; 13: 43-47.
140. Rosen DR, Siddique T, Patterson D et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 362: 59-62.
141. Turrens JF, Crapo JD, Freeman BA. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest* 1984; 73: 87-95.
142. Murthy MR, Reid TJ, 3rd, Sicignano A et al. Structure of beef liver catalase. *J Mol Biol* 1981; 152: 465-499.

143. Darr D, Fridovich I. Irreversible inactivation of catalase by 3-amino-1,2,4-triazole. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 3642.
144. Diaz A, Loewen PC, Fita I, Carpena X. Thirty years of heme catalases structural biology. *Arch Biochem Biophys* 2012; 525: 102-110.
145. Hirono A, Sasaya-Hamada F, Kanno H et al. A novel human catalase mutation (358 T->del) causing Japanese-type acatalasemia. *Blood Cells Mol Dis* 1995; 21: 232-234.
146. Temple MD, Perrone GG, Dawes IW. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 319-326.
147. Meister A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 1995; 251: 3-7.
148. Kosower EM. A structural and dynamic model for the nicotinic acetylcholine receptor. *Prog Clin Biol Res* 1989; 289: 279-292.
149. Liu RM, Gaston Pravia KA. Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 2010; 48: 1-15.
150. Lomaestro BM, Malone M. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Ann Pharmacother* 1995; 29: 1263-1273.
151. Richman PG, Meister A. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* 1975; 250: 1422-1426.
152. Aruoma OI, Halliwell B, Butler J, Hoey BM. Apparent inactivation of alpha 1-antiproteinase by sulphur-containing radicals derived from penicillamine. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 4353-4357.
153. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
154. Valko M, Leibfritz D, Moncol J et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
155. Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 1543-1552.
156. Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 1997; 272: 19633-19636.
157. Cadet J, Bellon S, Berger M et al. Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol Chem* 2002; 383: 933-943.
158. Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3: 1109-1115.
159. Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1986; 247: 1-11.
160. Devasagayam TP, Steenken S, Obendorf MS et al. Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry* 1991; 30: 6283-6289.
161. Krokan HE, Standal R, Slupphaug G. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J* 1997; 325 (Pt 1): 1-16.
162. Luo Y, Henle ES, Linn S. Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated fenton reactions. The deoxycytidine family. *J Biol Chem* 1996; 271: 21167-21176.
163. Imlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 1988; 240: 1302-1309.
164. Kurisu S, Miya T, Terato H et al. Quantitation of DNA damage by an aldehyde reactive probe (ARP). *Nucleic Acids Res Suppl* 2001; 45-46.

165. Midorikawa K, Murata M, Kawanishi S. Histone peptide AKRHRK enhances H(2)O(2)-induced DNA damage and alters its site specificity. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333: 1073-1077.
166. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 514-519.
167. Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 2006; 5: 145-152.
168. Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 2002; 1: 9.
169. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 457-465.
170. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 81-128.
171. Kannan K, Holcombe RF, Jain SK et al. Evidence for the induction of apoptosis by endosulfan in a human T-cell leukemic line. *Mol Cell Biochem* 2000; 205: 53-66.
172. Davies MJ. Protein and peptide alkoxyl radicals can give rise to C-terminal decarboxylation and backbone cleavage. *Arch Biochem Biophys* 1996; 336: 163-172.
173. Garrison WM, Weeks BM. Radiation chemistry of compounds containing the peptide bond. *Radiat Res* 1962; 17: 341-352.
174. Lee SR, Yang KS, Kwon J et al. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem* 2002; 277: 20336-20342.
175. Knapp LT, Klann E. Superoxide-induced stimulation of protein kinase C via thiol modification and modulation of zinc content. *J Biol Chem* 2000; 275: 24136-24145.
176. Furst R, Brueckl C, Kuebler WM et al. Atrial natriuretic peptide induces mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human endothelial cells via Rac1 and NAD(P)H oxidase/Nox2-activation. *Circ Res* 2005; 96: 43-53.
177. Barrett WC, DeGnore JP, Keng YF et al. Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 1999; 274: 34543-34546.
178. Salmeen A, Andersen JN, Myers MP et al. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* 2003; 423: 769-773.
179. Kamiguti AS, Serrander L, Lin K et al. Expression and activity of NOX5 in the circulating malignant B cells of hairy cell leukemia. *J Immunol* 2005; 175: 8424-8430.
180. Meng TC, Fukada T, Tonks NK. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell* 2002; 9: 387-399.
181. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004; 7: 97-110.
182. Laurent A, Nicco C, Chereau C et al. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res* 2005; 65: 948-956.
183. Konstantinov AA, Peskin AV, Popova E et al. Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1987; 894: 1-10.
184. Sztatowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 1991; 51: 794-798.
185. Zhou Y, Hileman EO, Plunkett W et al. Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. *Blood* 2003; 101: 4098-4104.

186. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004; 339: 1-9.
187. Ripple MO, Henry WF, Schwarze SR et al. Effect of antioxidants on androgen-induced AP-1 and NF-kappaB DNA-binding activity in prostate carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1227-1232.
188. Okamoto M, Kawai K, Reznikoff CA, Oyasu R. Transformation in vitro of a nontumorigenic rat urothelial cell line by hydrogen peroxide. *Cancer Res* 1996; 56: 4649-4653.
189. Mori K, Shibamura M, Nose K. Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2004; 64: 7464-7472.
190. Busuttill RA, Garcia AM, Cabrera C et al. Organ-specific increase in mutation accumulation and apoptosis rate in CuZn-superoxide dismutase-deficient mice. *Cancer Res* 2005; 65: 11271-11275.
191. Wu LT, Chu KH. Characterization of an ovary-specific glutathione peroxidase from the shrimp *Metapenaeus ensis* and its role in crustacean reproduction. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2011; 155: 26-33.
192. Ratnasinghe D, Tangrea JA, Andersen MR et al. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res* 2000; 60: 6381-6383.
193. Ravn-Haren G, Olsen A, Tjønneland A et al. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis* 2006; 27: 820-825.
194. Ichimura Y, Habuchi T, Tsuchiya N et al. Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. *J Urol* 2004; 172: 728-732.
195. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 602-606.
196. Murthy S, Adamcakova-Dodd A, Perry SS et al. Modulation of reactive oxygen species by Rac1 or catalase prevents asbestos-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 297: L846-855.
197. Kamp DW, Graceffa P, Pryor WA, Weitzman SA. The role of free radicals in asbestos-induced diseases. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 293-315.
198. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* 2006; 7: 149-156.
199. Gopalakrishna R, Chen ZH, Gundimeda U. Tobacco smoke tumor promoters, catechol and hydroquinone, induce oxidative regulation of protein kinase C and influence invasion and metastasis of lung carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 12233-12237.
200. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 276-285.
201. Hagen TM, Huang S, Curnutte J et al. Extensive oxidative DNA damage in hepatocytes of transgenic mice with chronic active hepatitis destined to develop hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 12808-12812.
202. Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE et al. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 2005; 436: 123-127.
203. Jackson AL, Loeb LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res* 2001; 477: 7-21.
204. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 775-794.

205. Ha HC, Thiagalingam A, Nelkin BD, Casero RA, Jr. Reactive oxygen species are critical for the growth and differentiation of medullary thyroid carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3783-3787.
206. Wartenberg M, Diedershausen H, Hescheler J, Sauer H. Growth stimulation versus induction of cell quiescence by hydrogen peroxide in prostate tumor spheroids is encoded by the duration of the Ca(2+) response. *J Biol Chem* 1999; 274: 27759-27767.
207. Brar SS, Kennedy TP, Whorton AR et al. Reactive oxygen species from NAD(P)H:quinone oxidoreductase constitutively activate NF-kappaB in malignant melanoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C659-676.
208. Arnold RS, Shi J, Murad E et al. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 5550-5555.
209. Irani K, Xia Y, Zweier JL et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 1997; 275: 1649-1652.
210. Brar SS, Corbin Z, Kennedy TP et al. NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285: C353-369.
211. Vaquero EC, Edderkaoui M, Pandol SJ et al. Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 34643-34654.
212. Leslie NR, Bennett D, Lindsay YE et al. Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *Embo J* 2003; 22: 5501-5510.
213. Mochizuki T, Furuta S, Mitsushita J et al. Inhibition of NADPH oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway in pancreatic cancer PANC-1 cells. *Oncogene* 2006; 25: 3699-3707.
214. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 180-186.
215. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103: 239-252.
216. Zhang Y, Chen F. Reactive oxygen species (ROS), troublemakers between nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK). *Cancer Res* 2004; 64: 1902-1905.
217. Benhar M, Engelberg D, Levitzki A. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep* 2002; 3: 420-425.
218. Burdon RH, Gill V, Rice-Evans C. Oxidative stress and tumour cell proliferation. *Free Radic Res Commun* 1990; 11: 65-76.
219. Nose K, Shibamura M, Kikuchi K et al. Transcriptional activation of early-response genes by hydrogen peroxide in a mouse osteoblastic cell line. *Eur J Biochem* 1991; 201: 99-106.
220. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 1999; 11: 1-14.
221. Escobar J, Pereda J, Lopez-Rodas G, Sastre J. Redox signaling and histone acetylation in acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 2012; 52: 819-837.
222. Pinkus R, Weiner LM, Daniel V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem* 1996; 271: 13422-13429.
223. Hsu TC, Young MR, Cmarik J, Colburn NH. Activator protein 1 (AP-1)- and nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1338-1348.

224. Yoon SO, Park SJ, Yoon SY et al. Sustained production of H₂O₂ activates pro-matrix metalloproteinase-2 through receptor tyrosine kinases/phosphatidylinositol 3-kinase/NF-kappa B pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 30271-30282.
225. Arbiser JL, Petros J, Klafter R et al. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 715-720.
226. Gorlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB et al. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 2001; 89: 47-54.
227. Maranchie JK, Zhan Y. Nox4 is critical for hypoxia-inducible factor 2-alpha transcriptional activity in von Hippel-Lindau-deficient renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65: 9190-9193.
228. Kietzmann T, Gorlach A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol* 2005; 16: 474-486.
229. Ziel KA, Grishko V, Campbell CC et al. Oxidants in signal transduction: impact on DNA integrity and gene expression. *Faseb J* 2005; 19: 387-394.
230. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999; 401: 79-82.
231. Geiszt M, Lekstrom K, Brenner S et al. NAD(P)H oxidase 1, a product of differentiated colon epithelial cells, can partially replace glycoprotein 91phox in the regulated production of superoxide by phagocytes. *J Immunol* 2003; 171: 299-306.
232. Chamulitrat W, Schmidt R, Tomakidi P et al. Association of gp91phox homolog Nox1 with anchorage-independent growth and MAP kinase-activation of transformed human keratinocytes. *Oncogene* 2003; 22: 6045-6053.
233. Brar SS, Kennedy TP, Sturrock AB et al. An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C1212-1224.
234. Lim SD, Sun C, Lambeth JD et al. Increased Nox1 and hydrogen peroxide in prostate cancer. *Prostate* 2005; 62: 200-207.
235. Mitsushita J, Lambeth JD, Kamata T. The superoxide-generating oxidase Nox1 is functionally required for Ras oncogene transformation. *Cancer Res* 2004; 64: 3580-3585.
236. Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1-11.
237. Li F, Wang Y, Zeller KI et al. Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 6225-6234.
238. Vafa O, Wade M, Kern S et al. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* 2002; 9: 1031-1044.
239. Krieg RC, Knuechel R, Schiffmann E et al. Mitochondrial proteome: cancer-altered metabolism associated with cytochrome c oxidase subunit level variation. *Proteomics* 2004; 4: 2789-2795.
240. Niemann S, Muller U, Engelhardt D, Lohse P. Autosomal dominant malignant and catecholamine-producing paraganglioma caused by a splice donor site mutation in SDHC. *Hum Genet* 2003; 113: 92-94.
241. Ishii T, Yasuda K, Akatsuka A et al. A mutation in the SDHC gene of complex II increases oxidative stress, resulting in apoptosis and tumorigenesis. *Cancer Res* 2005; 65: 203-209.
242. Carew JS, Zhou Y, Albitar M et al. Mitochondrial DNA mutations in primary leukemia cells after chemotherapy: clinical significance and therapeutic implications. *Leukemia* 2003; 17: 1437-1447.

243. Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E et al. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 719-724.
244. Shidara Y, Yamagata K, Kanamori T et al. Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer Res* 2005; 65: 1655-1663.
245. Oberley LW, Bize IB, Sahu SK et al. Superoxide dismutase activity of normal murine liver, regenerating liver, and H6 hepatoma. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61: 375-379.
246. Van Driel BE, Lyon H, Hoogenraad DC et al. Expression of CuZn- and Mn-superoxide dismutase in human colorectal neoplasms. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 435-444.
247. Huang Y, He T, Domann FE. Decreased expression of manganese superoxide dismutase in transformed cells is associated with increased cytosine methylation of the SOD2 gene. *DNA Cell Biol* 1999; 18: 643-652.
248. Xu Y, Krishnan A, Wan XS et al. Mutations in the promoter reveal a cause for the reduced expression of the human manganese superoxide dismutase gene in cancer cells. *Oncogene* 1999; 18: 93-102.
249. Janssen AM, Bosman CB, van Duijn W et al. Superoxide dismutases in gastric and esophageal cancer and the prognostic impact in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3183-3192.
250. Ishikawa M, Yaginuma Y, Hayashi H et al. Reactivity of a monoclonal antibody to manganese superoxide dismutase with human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1990; 50: 2538-2542.
251. Cobbs CS, Levi DS, Aldape K, Israel MA. Manganese superoxide dismutase expression in human central nervous system tumors. *Cancer Res* 1996; 56: 3192-3195.
252. Chung-man Ho J, Zheng S, Comhair SA et al. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 8578-8585.
253. Hu Y, Rosen DG, Zhou Y et al. Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. *J Biol Chem* 2005; 280: 39485-39492.
254. Tome ME, Johnson DB, Rimsza LM et al. A redox signature score identifies diffuse large B-cell lymphoma patients with a poor prognosis. *Blood* 2005; 106: 3594-3601.
255. De Craemer D, Pauwels M, Hautekeete M, Roels F. Alterations of hepatocellular peroxisomes in patients with cancer. Catalase cytochemistry and morphometry. *Cancer* 1993; 71: 3851-3858.
256. Kahlos K, Soini Y, Sormunen R et al. Expression and prognostic significance of catalase in malignant mesothelioma. *Cancer* 2001; 91: 1349-1357.
257. Mitchell JB, Phillips TL, DeGraff W et al. The relationship of SR-2508 sensitizer enhancement ratio to cellular glutathione levels in human tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12: 1143-1146.
258. Kanbagli O, Ozdemirler G, Bulut T et al. Mitochondrial lipid peroxides and antioxidant enzymes in colorectal adenocarcinoma tissues. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 1258-1263.
259. Staib F, Robles AI, Varticovski L et al. The p53 tumor suppressor network is a key responder to microenvironmental components of chronic inflammatory stress. *Cancer Res* 2005; 65: 10255-10264.
260. Achanta G, Huang P. Role of p53 in sensing oxidative DNA damage in response to reactive oxygen species-generating agents. *Cancer Res* 2004; 64: 6233-6239.
261. Achanta G, Sasaki R, Feng L et al. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *Embo J* 2005; 24: 3482-3492.

262. O'Connor JC, Wallace DM, O'Brien CJ, Cotter TG. A novel antioxidant function for the tumor-suppressor gene p53 in the retinal ganglion cell. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 4237-4244.
263. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV et al. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 2005; 11: 1306-1313.
264. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732.
265. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006; 3: 177-185.
266. Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet* 2000; 355: 1179-1180.
267. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med* 1978; 298: 659-668.
268. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000; 7: 153-163.
269. Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A et al. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood* 2001; 98: 2771-2777.
270. Galan A, Garcia-Bermejo L, Troyano A et al. The role of intracellular oxidation in death induction (apoptosis and necrosis) in human promonocytic cells treated with stress inducers (cadmium, heat, X-rays). *Eur J Cell Biol* 2001; 80: 312-320.
271. Hwang PM, Bunz F, Yu J et al. Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Nat Med* 2001; 7: 1111-1117.
272. Imoto M, Tanabe K, Simizu S et al. Inhibition of cyclin D1 expression and induction of apoptosis by inostamycin in small cell lung carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 315-322.
273. Jing Y, Dai J, Chalmers-Redman RM et al. Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. *Blood* 1999; 94: 2102-2111.
274. Mates JM, Segura JA, Alonso FJ, Marquez J. Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Arch Toxicol* 2012.
275. Perez-Galan P, Roue G, Villamor N et al. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood* 2006; 107: 257-264.
276. Roue G, Perez-Galan P, Lopez-Guerra M et al. Selective inhibition of IkappaB kinase sensitizes mantle cell lymphoma B cells to TRAIL by decreasing cellular FLIP level. *J Immunol* 2007; 178: 1923-1930.
277. Sancho P, Troyano A, Fernandez C et al. Differential effects of catalase on apoptosis induction in human promonocytic cells. Relationships with heat-shock protein expression. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 581-589.
278. Simizu S, Imoto M, Masuda N et al. Involvement of hydrogen peroxide production in erbstatin-induced apoptosis in human small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* 1996; 56: 4978-4982.
279. Simizu S, Takada M, Umezawa K, Imoto M. Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J Biol Chem* 1998; 273: 26900-26907.
280. Troyano A, Fernandez C, Sancho P et al. Effect of glutathione depletion on antitumor drug toxicity (apoptosis and necrosis) in U-937 human promonocytic cells. The role of intracellular oxidation. *J Biol Chem* 2001; 276: 47107-47115.

281. Troyano A, Sancho P, Fernandez C et al. The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells. *Cell Death Differ* 2003; 10: 889-898.
282. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75: 241-251.
283. Matsura T, Kai M, Fujii Y et al. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL-60 cells requires caspase-3 activation. *Free Radic Res* 1999; 30: 73-83.
284. Yamakawa H, Ito Y, Naganawa T et al. Activation of caspase-9 and -3 during H₂O₂-induced apoptosis of PC12 cells independent of ceramide formation. *Neurol Res* 2000; 22: 556-564.
285. Venkataraman S, Jiang X, Weydert C et al. Manganese superoxide dismutase overexpression inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer cells. *Oncogene* 2005; 24: 77-89.
286. Zhang Y, Zhao W, Zhang HJ et al. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. *Cancer Res* 2002; 62: 1205-1212.
287. Cullen JJ, Weydert C, Hinkhouse MM et al. The role of manganese superoxide dismutase in the growth of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 1297-1303.
288. Li S, Yan T, Yang JQ et al. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* 2000; 60: 3927-3939.
289. Tome ME, Baker AF, Powis G et al. Catalase-overexpressing thymocytes are resistant to glucocorticoid-induced apoptosis and exhibit increased net tumor growth. *Cancer Res* 2001; 61: 2766-2773.
290. Lu YP, Lou YR, Yen P et al. Enhanced skin carcinogenesis in transgenic mice with high expression of glutathione peroxidase or both glutathione peroxidase and superoxide dismutase. *Cancer Res* 1997; 57: 1468-1474.
291. Higuchi Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1527-1535.
292. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M et al. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 1995; 182: 367-377.
293. Zdolsek JM, Svensson I. Effect of reactive oxygen species on lysosomal membrane integrity. A study on a lysosomal fraction. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1993; 64: 401-406.
294. Madesh M, Hajnoczky G. VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J Cell Biol* 2001; 155: 1003-1015.
295. Bouchier-Hayes L, Lartigue L, Newmeyer DD. Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115: 2640-2647.
296. Ulivieri C. Cell death: insights into the ultrastructure of mitochondria. *Tissue Cell* 42: 339-347.
297. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 2003; 112: 481-490.
298. Sakon S, Xue X, Takekawa M et al. NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *Embo J* 2003; 22: 3898-3909.
299. Chen F, Castranova V, Li Z et al. Inhibitor of nuclear factor kappaB kinase deficiency enhances oxidative stress and prolongs c-Jun NH₂-terminal kinase activation induced by arsenic. *Cancer Res* 2003; 63: 7689-7693.

300. Deng X, Xiao L, Lang W et al. Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem* 2001; 276: 23681-23688.
301. Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* 1998; 333 (Pt 2): 291-300.
302. Chen YR, Shrivastava A, Tan TH. Down-regulation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphatase M3/6 and activation of JNK by hydrogen peroxide and pyrrolidine dithiocarbamate. *Oncogene* 2001; 20: 367-374.
303. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J* 1998; 17: 2596-2606.
304. Adler V, Yin Z, Fuchs SY et al. Regulation of JNK signaling by GSTp. *Embo J* 1999; 18: 1321-1334.
305. Lei K, Davis RJ. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 2432-2437.
306. Benhar M, Dalyot I, Engelberg D, Levitzki A. Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 6913-6926.
307. Shiah SG, Chuang SE, Chau YP et al. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase and subsequent CPP32/Yama during topoisomerase inhibitor beta-lapachone-induced apoptosis through an oxidation-dependent pathway. *Cancer Res* 1999; 59: 391-398.
308. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 301-310.
309. Nishi T, Shimizu N, Hiramoto M et al. Spatial redox regulation of a critical cysteine residue of NF-kappa B in vivo. *J Biol Chem* 2002; 277: 44548-44556.
310. Korn SH, Wouters EF, Vos N, Janssen-Heininger YM. Cytokine-induced activation of nuclear factor-kappa B is inhibited by hydrogen peroxide through oxidative inactivation of IkappaB kinase. *J Biol Chem* 2001; 276: 35693-35700.
311. Andrieu-Abadie N, Gouaze V, Salvayre R, Levade T. Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 717-728.
312. Won JS, Singh I. Sphingolipid signaling and redox regulation. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1875-1888.
313. Bensaad K, Vousden KH. Savior and slayer: the two faces of p53. *Nat Med* 2005; 11: 1278-1279.
314. Kong Q, Beel JA, Lillehei KO. A threshold concept for cancer therapy. *Med Hypotheses* 2000; 55: 29-35.
315. Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 639-645.
316. Dvorakova K, Payne CM, Tome ME et al. Induction of oxidative stress and apoptosis in myeloma cells by the aziridine-containing agent imexon. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 749-758.
317. Xu K, Thornalley PJ. Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukaemia cells in vitro. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 165-177.
318. Zhang Y, Talalay P. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer Res* 1994; 54: 1976s-1981s.
319. Griffith OW, Meister A. Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* 1979; 254: 7558-7560.

320. Lo M, Wang YZ, Gout PW. The x(c)- cystine/glutamate antiporter: a potential target for therapy of cancer and other diseases. *J Cell Physiol* 2008; 215: 593-602.
321. Ceccarelli J, Delfino L, Zappia E et al. The redox state of the lung cancer microenvironment depends on the levels of thioredoxin expressed by tumor cells and affects tumor progression and response to prooxidants. *Int J Cancer* 2008; 123: 1770-1778.
322. Kaimul AM, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cancer and metabolic syndrome. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 861-868.
323. Kirkpatrick DL, Ehrmantraut G, Stettner S et al. Redox active disulfides: the thioredoxin system as a drug target. *Oncol Res* 1997; 9: 351-356.
324. Welsh SJ, Williams RR, Birmingham A et al. The thioredoxin redox inhibitors 1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide and pleurotin inhibit hypoxia-induced factor 1alpha and vascular endothelial growth factor formation. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 235-243.
325. Zhou P, Kalakonda N, Comenzo RL. Changes in gene expression profiles of multiple myeloma cells induced by arsenic trioxide (ATO): possible mechanisms to explain ATO resistance in vivo. *Br J Haematol* 2005; 128: 636-644.
326. Hoshida Y, Moriyama M, Otsuka M et al. Gene expressions associated with chemosensitivity in human hepatoma cells. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 489-492.
327. Ramanathan B, Jan KY, Chen CH et al. Resistance to paclitaxel is proportional to cellular total antioxidant capacity. *Cancer Res* 2005; 65: 8455-8460.
328. Montero AJ, Jassem J. Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer. *Drugs* 2011; 71: 1385-1396.
329. Townsend DM, He L, Hutchens S et al. NOV-002, a glutathione disulfide mimetic, as a modulator of cellular redox balance. *Cancer Res* 2008; 68: 2870-2877.
330. Townsend DM, Pazoles CJ, Tew KD. NOV-002, a mimetic of glutathione disulfide. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17: 1075-1083.
331. Griffith OW. Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem* 1982; 257: 13704-13712.
332. Tew KD. TLK-286: a novel glutathione S-transferase-activated prodrug. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14: 1047-1054.
333. Edelman MJ. Novel cytotoxic agents for non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2006; 1: 752-755.
334. Ruscoe JE, Rosario LA, Wang T et al. Pharmacologic or genetic manipulation of glutathione S-transferase P1-1 (GSTpi) influences cell proliferation pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 339-345.
335. Yip NC, Fombon IS, Liu P et al. Disulfiram modulated ROS-MAPK and NFkappaB pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties. *Br J Cancer* 2012; 104: 1564-1574.
336. Wondrak GT. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 3013-3069.
337. Baker AF, Dragovich T, Tate WR et al. The antitumor thioredoxin-1 inhibitor PX-12 (1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide) decreases thioredoxin-1 and VEGF levels in cancer patient plasma. *J Lab Clin Med* 2006; 147: 83-90.
338. Hausheer FH, Shanmugarajah D, Leverett BD et al. Mechanistic study of BNP7787-mediated cisplatin nephroprotection: modulation of gamma-glutamyl transpeptidase. *Cancer Chemother Pharmacol* 65: 941-951.
339. Magda D, Miller RA. Motexafin gadolinium: a novel redox active drug for cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 466-476.

340. Quintas-Cardama A, Verstovsek S, Freireich E et al. Chemical and clinical development of darinaparsin, a novel organic arsenic derivative. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8: 904-909.
341. Kensler TW, Trush MA. Inhibition of oxygen radical metabolism in phorbol ester-activated polymorphonuclear leukocytes by an antitumor promoting copper complex with superoxide dismutase-mimetic activity. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 3485-3487.
342. Kubota S, Yang JT. Bis[cyclo(histidylhistidine)]copper(II) complex that mimicks the active center of superoxide dismutase has its catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 3283-3286.
343. Bijloo GJ, van der Goot H, Bast A, Timmerman H. Copper complexes of 1,10-phenanthroline and related compounds as superoxide dismutase mimetics. *J Inorg Biochem* 1990; 40: 237-244.
344. Muscoli C, Cuzzocrea S, Riley DP et al. On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 445-460.
345. Alexandre J, Nicco C, Chereau C et al. Improvement of the therapeutic index of anticancer drugs by the superoxide dismutase mimic mangafodipir. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 236-244.
346. Bedda S, Laurent A, Conti F et al. Mangafodipir prevents liver injury induced by acetaminophen in the mouse. *J Hepatol* 2003; 39: 765-772.
347. Coriat R, Leconte M, Kaviani N et al. Mangafodipir protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *PLoS One* 2011; 6: e27005.
348. Diaz-Montero CM, Wang Y, Shao L et al. The glutathione disulfide mimetic NOV-002 inhibits cyclophosphamide-induced hematopoietic and immune suppression by reducing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2012; 52: 1560-1568.
349. Townsend DM, Tew KD. Pharmacology of a mimetic of glutathione disulfide, NOV-002. *Biomed Pharmacother* 2009; 63: 75-78.
350. Arrick BA, Griffith OW, Cerami A. Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for trypanosomiasis. *J Exp Med* 1981; 153: 720-725.
351. Martensson J, Jain A, Stole E et al. Inhibition of glutathione synthesis in the newborn rat: a model for endogenously produced oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 9360-9364.
352. Miller WH, Jr., Schipper HM, Lee JS et al. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res* 2002; 62: 3893-3903.
353. Lynn S, Shiung JN, Gurr JR, Jan KY. Arsenite stimulates poly(ADP-ribosylation) by generation of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 442-449.
354. Gurr JR, Yih LH, Samikkannu T et al. Nitric oxide production by arsenite. *Mutat Res* 2003; 533: 173-182.
355. Chou WC, Jie C, Kenedy AA et al. Role of NADPH oxidase in arsenic-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4578-4583.
356. Lemarie A, Bourdonnay E, Morzadec C et al. Inorganic arsenic activates reduced NADPH oxidase in human primary macrophages through a Rho kinase/p38 kinase pathway. *J Immunol* 2008; 180: 6010-6017.
357. Qian Y, Liu KJ, Chen Y et al. Cdc42 regulates arsenic-induced NADPH oxidase activation and cell migration through actin filament reorganization. *J Biol Chem* 2005; 280: 3875-3884.
358. Toft KG, Hustvedt SO, Grant D et al. Metabolism and pharmacokinetics of MnDPDP in man. *Acta Radiol* 1997; 38: 677-689.

359. Karlsson JO, Adolfsson K, Thelin B et al. First clinical experience with the magnetic resonance imaging contrast agent and superoxide dismutase mimetic mangafodipir as an adjunct in cancer chemotherapy-a translational study. *Transl Oncol* 2012; 5: 32-38.
360. Hirt D, Richardet JP, Urien S et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of manganese after a single intravenous infusion of mangafodipir in patients with acute alcoholic hepatitis. *Ther Drug Monit* 2009; 31: 557-565.
361. Beckman JS, Minor RL, Jr., White CW et al. Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J Biol Chem* 1988; 263: 6884-6892.
362. Petkau A. Scientific basis for the clinical use of superoxide dismutase. *Cancer Treat Rev* 1986; 13: 17-44.
363. Czapski G, Goldstein S. Superoxide scavengers and SOD or SOD mimics. *Adv Exp Med Biol* 1990; 264: 45-50.
364. Leuthauser SW, Oberley LW, Oberley TD et al. Antitumor effect of a copper coordination compound with superoxide dismutase-like activity. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 1077-1081.
365. Oberley LW, Rogers KL, Schutt L et al. Possible role of glutathione in the antitumor effect of a copper-containing synthetic superoxide dismutase in mice. *J Natl Cancer Inst* 1983; 71: 1089-1094.
366. Duran HA, Lanfranchi H, Palmieri MA, de Rey BM. Inhibition of benzoyl peroxide-induced tumor promotion and progression by copper(II)(3,5-diisopropylsalicylate)₂. *Cancer Lett* 1993; 69: 167-172.
367. Gariboldi MB, Lucchi S, Caserini C et al. Antiproliferative effect of the piperidine nitroxide TEMPOL on neoplastic and nonneoplastic mammalian cell lines. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 913-923.
368. Gariboldi MB, Ravizza R, Petterino C et al. Study of in vitro and in vivo effects of the piperidine nitroxide Tempol--a potential new therapeutic agent for gliomas. *Eur J Cancer* 2003; 39: 829-837.
369. Samuni A, Mitchell JB, DeGraff W et al. Nitroxide SOD-mimics: modes of action. *Free Radic Res Commun* 1991; 12-13 Pt 1: 187-194.
370. Crapo JD, Day BJ. Modulation of nitric oxide responses in asthma by extracellular antioxidants. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 743-746.
371. Day BJ, Batinic-Haberle I, Crapo JD. Metalloporphyrins are potent inhibitors of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 730-736.
372. Doctrow SR, Huffman K, Marcus CB et al. Salen-manganese complexes: combined superoxide dismutase/catalase mimics with broad pharmacological efficacy. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 247-269.
373. Sinha BK, Mimnaugh EG, Rajagopalan S, Myers CE. Adriamycin activation and oxygen free radical formation in human breast tumor cells: protective role of glutathione peroxidase in adriamycin resistance. *Cancer Res* 1989; 49: 3844-3848.
374. Konorev EA, Kennedy MC, Kalyanaraman B. Cell-permeable superoxide dismutase and glutathione peroxidase mimetics afford superior protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity: the role of reactive oxygen and nitrogen intermediates. *Arch Biochem Biophys* 1999; 368: 421-428.
375. Samuni A, Winkelsberg D, Pinson A et al. Nitroxide stable radicals protect beating cardiomyocytes against oxidative damage. *J Clin Invest* 1991; 87: 1526-1530.
376. Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S et al. The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest* 1996; 98: 1253-1260.

377. Doroshow JH, Akman S, Esworthy S et al. Doxorubicin resistance conferred by selective enhancement of intracellular glutathione peroxidase or superoxide dismutase content in human MCF-7 breast cancer cells. *Free Radic Res Commun* 1991; 12-13 Pt 2: 779-781.
378. Hirose K, Longo DL, Oppenheim JJ, Matsushima K. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation. *Faseb J* 1993; 7: 361-368.
379. Gariboldi MB, Terni F, Ravizza R et al. The nitroxide Tempol modulates anthracycline resistance in breast cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1409-1418.
380. Oury TD, Thakker K, Menache M et al. Attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by a catalytic antioxidant metalloporphyrin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25: 164-169.
381. Lefaix JL, Delanian S, Leplat JJ et al. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using Cu/Zn-SOD and Mn-SOD: an experimental study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 35: 305-312.
382. Esco R, Valencia J, Coronel P et al. Efficacy of orgotein in prevention of late side effects of pelvic irradiation: a randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 60: 1211-1219.
383. Robbins ME, Zhao W. Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review. *Int J Radiat Biol* 2004; 80: 251-259.
384. Soderberg LS, Barnett JB, Baker ML et al. Postirradiation treatment with copper(II)2(3,5-diisopropylsalicylate)4 enhances radiation recovery and hemopoietic regeneration. *Exp Hematol* 1990; 18: 801-805.
385. Urano M, Kuroda M, Reynolds R et al. Expression of manganese superoxide dismutase reduces tumor control radiation dose: gene-radiotherapy. *Cancer Res* 1995; 55: 2490-2493.
386. Moeller BJ, Batinic-Haberle I, Spasojevic I et al. A manganese porphyrin superoxide dismutase mimetic enhances tumor radioresponsiveness. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 63: 545-552.
387. Scheuhammer AM, Cherian MG. Binding of manganese in human and rat plasma. *Biochim Biophys Acta* 1985; 840: 163-169.
388. Bailey HH, Mulcahy RT, Tutsch KD et al. Phase I clinical trial of intravenous L-buthionine sulfoximine and melphalan: an attempt at modulation of glutathione. *J Clin Oncol* 1994; 12: 194-205.
389. Bailey HH, Ripple G, Tutsch KD et al. Phase I study of continuous-infusion L-S,R-buthionine sulfoximine with intravenous melphalan. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1789-1796.
390. Caja L, Sancho P, Bertran E et al. Overactivation of the MEK/ERK pathway in liver tumor cells confers resistance to TGF- β -induced cell death through impairing up-regulation of the NADPH oxidase NOX4. *Cancer Res* 2009; 69: 7595-7602.
391. Ding ZB, Hui B, Shi YH et al. Autophagy Activation in Hepatocellular Carcinoma Contributes to the Tolerance of Oxaliplatin via Reactive Oxygen Species Modulation. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 6229-6238.
392. Lawless MW, O'Byrne KJ, Gray SG. Targeting oxidative stress in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14: 1225-1245.
393. Polyak K, Xia Y, Zweier JL et al. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997; 389: 300-305.
394. Raymond E, Dahan L, Raoul JL et al. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011; 364: 501-513.

395. Brugarolas J. Renal-cell carcinoma--molecular pathways and therapies. *N Engl J Med* 2007; 356: 185-187.
396. Escudier B, Eisen T, Stadler WM et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356: 125-134.
397. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 378-390.
398. Chiou JF, Tai CJ, Wang YH et al. Sorafenib induces preferential apoptotic killing of a drug- and radio-resistant Hep G2 cells through a mitochondria-dependent oxidative stress mechanism. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 1904-1913.
399. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.
400. Bruix J, Sherman M, Llovet JM et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2001; 35: 421-430.
401. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362: 1907-1917.
402. Wilhelm SM, Carter C, Tang L et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 7099-7109.
403. Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J et al. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 698-711.
404. Liu L, Cao Y, Chen C et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* 2006; 66: 11851-11858.
405. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; 394: 485-490.
406. Schmidt CM, McKillop IH, Cahill PA, Sitzmann JV. Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 54-58.
407. Wiesenauer CA, Yip-Schneider MT, Wang Y, Schmidt CM. Multiple anticancer effects of blocking MEK-ERK signaling in hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg* 2004; 198: 410-421.
408. Balmano K, Cook SJ. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ* 2009; 16: 368-377.
409. Carmona-Cuenca I, Roncero C, Sancho P et al. Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity. *J Hepatol* 2008; 49: 965-976.
410. Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 2004; 337: 1-13.
411. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1191-1212.
412. Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S, Ma N. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biol Chem* 2006; 387: 365-372.
413. Edeline J, Boucher E, Rolland Y et al. Comparison of tumor response by Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) and modified RECIST in patients treated with sorafenib for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2012; 118: 147-156.

414. Lencioni R, Llovet JM. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2010; 30: 52-60.
415. Choi H. Response evaluation of gastrointestinal stromal tumors. *Oncologist* 2008; 13 Suppl 2: 4-7.
416. Tai WT, Cheng AL, Shiau CW et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is a major kinase-independent target of sorafenib in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2011.
417. Brandes RP, Koddenberg G, Gwinner W et al. Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. *Hypertension* 1999; 33: 1243-1249.
418. Lee AC, Fenster BE, Ito H et al. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 1999; 274: 7936-7940.
419. Cotter G, Kaluski E, Milo O et al. LINCIS: L-NAME (a NO synthase inhibitor) in the treatment of refractory cardiogenic shock: a prospective randomized study. *Eur Heart J* 2003; 24: 1287-1295.
420. Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S et al. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *Embo J* 1991; 10: 1723-1732.
421. Valverde P, Manning P, McNeil CJ, Thody AJ. Activation of tyrosinase reduces the cytotoxic effects of the superoxide anion in B16 mouse melanoma cells. *Pigment Cell Res* 1996; 9: 77-84.
422. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 11715-11720.
423. Choi SI, Jeong CS, Cho SY, Lee YS. Mechanism of apoptosis induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells: involvement of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase. *Arch Pharm Res* 2007; 30: 1328-1335.
424. Servettaz A, Guilpain P, Goulvestre C et al. Radical oxygen species production induced by advanced oxidation protein products predicts clinical evolution and response to treatment in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1202-1209.
425. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2343-2351.
426. Ibrahim A, Hirschfeld S, Cohen MH et al. FDA drug approval summaries: oxaliplatin. *Oncologist* 2004; 9: 8-12.
427. Eastman A. Reevaluation of interaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA. *Biochemistry* 1986; 25: 3912-3915.
428. Masuda H, Tanaka T, Takahama U. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 1175-1180.
429. Eastman A. Glutathione-mediated activation of anticancer platinum(IV) complexes. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 4177-4178.
430. Waly MI, Al Moundhri MS, Ali BH. Effect of curcumin on cisplatin- and oxaliplatin-induced oxidative stress in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. *Ren Fail* 2011; 33: 518-523.
431. Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin Pharmacother* 2003; 4: 889-901.
432. Ocean AJ, Vahdat LT. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: pathogenesis and emerging therapies. *Support Care Cancer* 2004; 12: 619-625.
433. Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander M, Kiernan MC. Oxaliplatin-induced neurotoxicity and the development of neuropathy. *Muscle Nerve* 2005; 32: 51-60.

434. Extra JM, Marty M, Brienza S, Misset JL. Pharmacokinetics and safety profile of oxaliplatin. *Semin Oncol* 1998; 25: 13-22.
435. Holmes J, Stanko J, Varchenko M et al. Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, cisplatin, and ormaplatin in a Wistar rat model. *Toxicol Sci* 1998; 46: 342-351.
436. Gamelin L, Boisdron-Celle M, Delva R et al. Prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity by calcium and magnesium infusions: a retrospective study of 161 patients receiving oxaliplatin combined with 5-Fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4055-4061.
437. Durand JP, Mir O, Coriat R et al. Validation of the Cochin Risk Index Score (CRIS) for life expectancy prediction in terminally ill cancer patients. *Support Care Cancer* 2011.
438. Lersch C, Schmelz R, Eckel F et al. Prevention of oxaliplatin-induced peripheral sensory neuropathy by carbamazepine in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2002; 2: 54-58.
439. Mollman JE. Cisplatin neurotoxicity. *N Engl J Med* 1990; 322: 126-127.
440. Goss-Sampson MA, MacEvilly CJ, Muller DP. Longitudinal studies of the neurobiology of vitamin E and other antioxidant systems, and neurological function in the vitamin E deficient rat. *J Neurol Sci* 1988; 87: 25-35.
441. Cascinu S, Catalano V, Cordella L et al. Neuroprotective effect of reduced glutathione on oxaliplatin-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3478-3483.
442. Tomlinson SE, Tan SV, Kullmann DM et al. Nerve excitability studies characterize Kv1.1 fast potassium channel dysfunction in patients with episodic ataxia type 1. *Brain* 2010; 133: 3530-3540.
443. Gamelin E, Gamelin L, Bossi L, Quasthoff S. Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures. *Semin Oncol* 2002; 29: 21-33.
444. Argyriou AA, Polychronopoulos P, Iconomou G et al. A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage. *Cancer Treat Rev* 2008; 34: 368-377.
445. Grolleau F, Gamelin L, Boisdron-Celle M et al. A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J Neurophysiol* 2001; 85: 2293-2297.
446. Yang TT, Wang SJ. Pyridoxine inhibits depolarization-evoked glutamate release in nerve terminals from rat cerebral cortex: a possible neuroprotective mechanism? *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 331: 244-254.
447. Allchorne AJ, Broom DC, Woolf CJ. Detection of cold pain, cold allodynia and cold hyperalgesia in freely behaving rats. *Mol Pain* 2005; 1: 36.
448. Boerio D, Greensmith L, Bostock H. Excitability properties of motor axons in the maturing mouse. *J Peripher Nerv Syst* 2009; 14: 45-53.
449. Roelofs RI, Hrushesky W, Rogin J, Rosenberg L. Peripheral sensory neuropathy and cisplatin chemotherapy. *Neurology* 1984; 34: 934-938.
450. Wilson RH, Lehky T, Thomas RR et al. Acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1767-1774.
451. Kiernan MC. The pain with platinum: oxaliplatin and neuropathy. *Eur J Cancer* 2007; 43: 2631-2633.
452. Park SB, Goldstein D, Lin CS et al. Acute abnormalities of sensory nerve function associated with oxaliplatin-induced neurotoxicity. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1243-1249.
453. Ang CD, Alviar MJ, Dans AL et al. Vitamin B for treating peripheral neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; CD004573.

454. Karlsson JO, Brurok H, Eriksen M et al. Cardioprotective effects of the MR contrast agent MnDPDP and its metabolite MnPLED upon reperfusion of the ischemic porcine myocardium. *Acta Radiol* 2001; 42: 540-547.
455. Perl DP, Olanow CW. The neuropathology of manganese-induced Parkinsonism. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 675-682.
456. Rovetta F, Catalani S, Steimberg N et al. Organ-specific manganese toxicity: a comparative in vitro study on five cellular models exposed to MnCl(2). *Toxicol In Vitro* 2007; 21: 284-292.
457. Goldberg DM, Spooner RJ. Assay of glutathione reductase. . Bergmeyer HV eds. *Methods of enzymatic analysis* 3rd ed. 1983; Verlag Chemie Deerfield Beach, F: 258-265.
458. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233: 357-363.
459. Ashraf M, Scotchel PL, Krall JM, Flink EB. cis-Platinum-induced hypomagnesemia and peripheral neuropathy. *Gynecol Oncol* 1983; 16: 309-318.
460. de Gramont A, Figer A, Seymour M et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2938-2947.
461. Thompson SW, Davis LE, Kornfeld M et al. Cisplatin neuropathy. Clinical, electrophysiologic, morphologic, and toxicologic studies. *Cancer* 1984; 54: 1269-1275.
462. Oberley TD, Oberley LW. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol* 1997; 12: 525-535.
463. Gupta A, Rosenberger SF, Bowden GT. Increased ROS levels contribute to elevated transcription factor and MAP kinase activities in malignantly progressed mouse keratinocyte cell lines. *Carcinogenesis* 1999; 20: 2063-2073.
464. Jabs T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 231-245.
465. Hussain SP, Amstad P, He P et al. p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res* 2004; 64: 2350-2356.
466. Laparra JM, Velez D, Barbera R et al. As2O3-induced oxidative stress and cycle progression in a human intestinal epithelial cell line (Caco-2). *Toxicol In Vitro* 2008; 22: 444-449.
467. Giles GI, Giles NM, Collins CA et al. Electrochemical, in vitro and cell culture analysis of integrated redox catalysts: implications for cancer therapy. *Chem Commun (Camb)* 2003; 2030-2031.
468. Fry FH, Holme AL, Giles NM et al. Multifunctional redox catalysts as selective enhancers of oxidative stress. *Org Biomol Chem* 2005; 3: 2579-2587.
469. Giles GI, Fry FH, Tasker KM et al. Evaluation of sulfur, selenium and tellurium catalysts with antioxidant potential. *Org Biomol Chem* 2003; 1: 4317-4322.
470. Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem* 1990; 190: 360-365.
471. Coriat R, Marut W, Leconte M et al. The organotelluride catalyst LAB027 prevents colon cancer growth in the mice. *Cell Death Dis* 2011; 2: e191.

ANNEXE

Notre travail sur les mimétiques de la SOD, et notamment sur le mangafodipir nous a permis de mettre en évidence l'intérêt thérapeutique des modulateurs du stress oxydant en oncologie et leur effet pharmacoprotecteur. En parallèle de ce travail sur l'optimisation thérapeutique en oncologie, nous avons également évalué l'effet protecteur du mangafodipir sur des hépatocytes lors du stress induit par les phénomènes d'ischémie reperfusion.

La perte sanguine et les transfusions au cours de la résection hépatique ont un impact délétère sur les résultats à court et à long terme. Lors d'une hépatectomie, le saignement per-opératoire est prévenu par un clampage du pédicule hépatique. Ce clampage vasculaire engendre un mécanisme d'ischémie-reperfusion (I / R). Deux stratégies chirurgicales ont été développées afin de minimiser les lésions induites par l'ischémie et la reperfusion: un clampage intermittent (IC) avec des courtes périodes régulières de reperfusion. L'alternative à l'IC est le pré-conditionnement à l'ischémie (IP) qui consiste en une brève période de reperfusion avant l'ischémie prolongée.

Des études sur des modèles animaux des phénomènes d'ischémie-reperfusion ont suggéré qu'une pharmaco-protection peut être réalisée par une diminution du niveau de stress oxydant. Les FRO ont été identifiées comme des molécules entraînant source de lésions cellulaires après la reperfusion post ischémie hépatique.

Parce que le stress oxydant joue un rôle important dans les lésions d'I / R, nous avons émis l'hypothèse que l'administration d'une molécule modulatrice du stress oxydant pourrait présenter un intérêt thérapeutique. Par conséquent, nous avons choisi pour confirmer cette hypothèse de tester le mangafodipir, qui est doté comme nous l'avons vu plus haut d'une activité SOD, catalase et glutathion réductase. Le but de notre étude était de déterminer l'activité thérapeutique du mangafodipir dans un modèle murin de lésions hépatiques induites lors de l'I / R et de le comparer aux lésions constatées lors du IC et de l'IP.

Grâce à ce modèle murin, nous avons mis en évidence que le mangafodipir est efficace en prévention des lésions induites au cours de la chirurgie hépatique lors de l'ischémie-reperfusion. Enfin, par rapport au clampage intermittent, il réduit les pertes sanguines et la durée de la chirurgie.

FIN